

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**USO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$   
NA ANÁLISE DE UVAS E VINHOS BRASILEIROS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

ALUNO: Msc. Fabiana Mortimer Amaral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Florianópolis, setembro de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

USO DA ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$   
NA ANÁLISE DE UVAS E VINHOS BRASILEIROS

**FABIANA MORTIMER AMARAL**

**Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de**

**DOUTOR EM QUÍMICA**

**ESPECIALIDADE QUÍMICA ANALÍTICA**

**sendo aprovada em sua forma final.**

---

**Prof. Miguel Soriano Balparda Caro**

Orientador

---

**Prof. Faruk José Nome Aguilera**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Nilo Zanatta**

Relator

---

**Prof. Luis Augusto dos Santos Madureira**

---

**Prof<sup>a</sup>. Lúcia Felicidade Dias**

---

**Prof<sup>a</sup>. Vera Lucia A. Frescura Bascuñan**

---

**Prof. Nito Ângelo Debacher**



*Agradeço ao meu marido e  
companheiro Gean, a minha  
família, aos amigos e a Deus.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Miguel S.B.Caro, pela orientação, amizade e oportunidade de desenvolver este trabalho, possibilitando a ampliação dos meus conhecimentos e formação do meu espírito científico. Minha gratidão e respeito.

A vinícola Marson, ao Sr. Odilon Salmoria e Sr. Assis Ferri proprietários do vinhedo Videcar em Videira, ao Sr. Nelson Hessen e Sra. Regina Hessen, ao Sr. Francisco Brito e demais proprietários do vinhedo Quinta da Neve em São Joaquim, pelo interesse e apoio para a obtenção das amostras e informações que viabilizaram a execução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, da central de análises e colegas de curso, que em meio a tanto trabalho e preocupação tivemos tempo para compartilhar bons momentos juntos. Não esquecerei das conversas a cerca do trabalho e mesmo da vida, e do companheirismo que nunca faltou.

Ao Prof. Faruk Nome e a Prof. Haidi a quem tenho grande respeito e gratidão, não somente pela ajuda disponibilizada para a realização deste trabalho, mas também pela amizade.

Ao Prof. Nilo Zanatta relator desta tese, e aos professores que gentilmente aceitaram fazer parte da banca examinadora, aos quais tenho grande respeito e reconhecimento.

Aos professores do Departamento de Química, aos que tive a oportunidade de ser aluna e aos que se tornaram grandes amigos.

A Pós-Graduação, pela oportunidade de realização desta defesa de tese e aos funcionários Graça e Jadir, que além da eficiência com que tratam das questões burocráticas, nos permitem sua amizade e carinho.

A minha família por me ensinarem valores que a escola não ensina. Ensinarem-me que aqueles que realmente torcem por você são aqueles que partilham de sua alegria.

Ao grande companheiro Gean Salmoria, pela amizade, pelas longas discussões de cunho tecnológico, pela ajuda para superar as dificuldades e compartilhar as alegrias.

A Deus, por todo dia iluminar meu caminho, me abençoar e ampliar meus horizontes.

A UFSC e CNPq, pela oportunidade e suporte financeiro que possibilitou que este trabalho fosse realizado.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xix
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificativas	1
1.2 Objetivos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) na análise de alimentos	5
2.1.1 Princípios básicos da ressonância magnética nuclear.	6
2.1.2 Aplicações práticas dos processos de relaxação.	14
2.1.3 Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alto campo na análise de alimentos líquidos e sólidos.	19
2.2 Uvas e vinhos	34
2.2.1 Cultivo de uvas <i>Vitis viníferas</i> .	36
2.2.2 Elaboração de vinhos finos.	44
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1 Reagentes utilizados	47
3.2 Limite de detecção e Curva de calibração	47
3.2.1 Instrumentação para obtenção de espectros de RMN de $^1\text{H}$ (4,7Tesla).	47
3.2.2 Instrumentação para obtenção de espectros de RMN de $^1\text{H}$	48

(9,4Tesla).	
3.2.3 Limite de detecção e curva de calibração para espectrômetro de RMN de 4,7Tesla.	49
3.2.4 Limite de detecção e curva de calibração para o espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla.	50
<b>3.3 Análise de vinhos Chardonnay brasileiros por espectroscopia de RMN de <math>^1\text{H}</math> e <math>^{13}\text{C}</math> (4,7 Tesla)</b>	<b>52</b>
3.3.1 Amostras de vinhos brasileiros.	52
3.3.2 Técnicas de pré-preparo das amostras.	52
3.3.3 Parâmetros de obtenção dos espectros.	53
3.3.4 Análise qualitativa das amostras de vinho por RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .	54
<b>3.4 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN durante o crescimento das uvas Cabernet Sauvignon e Chardonnay</b>	<b>55</b>
3.4.1 Amostragem e coleta.	55
3.4.2 Características físicas do cacho e da baga.	58
3.4.3 Medidas de índice de refração ( $^{\circ}$ Brix), pH e acidez titulável.	59
3.4.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .	60
3.4.5 Validação da metodologia.	61
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Limite de detecção e curva de calibração</b>	<b>62</b>
4.1.1 Cálculo do tempo de relaxação spin-rede ( $T_1$ ) para o espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla.	62
4.1.2 Limite de detecção e curva de calibração para espectrômetro de RMN de 4,7Tesla.	63
4.1.3 Curva de calibração para o espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla.	66
4.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação calculado para o	72



espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla.

<b>4.2 Análise de vinhos brancos (Chardonnay) brasileiros por espectroscopia de RMN (4,7 Tesla)</b>	<b>78</b>
4.2.1 Análise direta de vinhos brancos (Chardonnay) brasileiros por RMN de $^1\text{H}$ em espectrômetro de 4,7 Tesla.	78
4.2.2 Pré-preparo das amostras de vinhos para análise por RMN de $^1\text{H}$ em espectrômetro de 4,7 Tesla.	80
<b>4.3 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN (9,4 Tesla) durante o crescimento da uva Chardonnay sob porta-enxerto Palsen 1103 cultivada no município de São Joaquim</b>	<b>88</b>
4.3.1 Características físicas.	89
4.3.2 Determinação de grau Brix.	93
4.3.3 Determinação de pH e acidez titulável.	95
4.3.4 Determinação qualitativa e quantitativa da composição química por ressonância magnética nuclear.	97
4.3.5 Validação da metodologia.	111
<b>4.4 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN (9,4 Tesla) durante o crescimento da uva Cabernet sauvignon sob porta-enxerto Palsen 1103 cultivada no município de São Joaquim</b>	<b>113</b>
4.4.1 Características físicas.	113
4.4.2 Determinação de grau Brix.	118
4.4.3 Determinação de pH e acidez titulável.	119
4.4.4 Determinação qualitativa e quantitativa da composição química por ressonância magnética nuclear.	121
<b>4.5 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN (9,4 Tesla) durante</b>	<b>126</b>

**o crescimento da uva Cabernet sauvignon sob os porta-enxertos 04343  
e Paulsen 1103 cultivada no município de Videira**

4.5.1 Características físicas.	126
4.5.2 Determinação de grau Brix.	131
4.5.3 Determinação de pH e acidez titulável.	132
4.5.4 Determinação qualitativa e quantitativa da composição química por ressonância magnética nuclear.	135
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>144</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>148</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação dos níveis de energia para um núcleo com número quântico de spin de $\frac{1}{2}$ sob a influência de um campo magnético.	7
<b>Figura 2:</b> (a) comportamento dos momentos magnéticos dos núcleos no sistema de coordenadas Cartesianas e (b), (c) e (d) coordenadas giratórias em um experimento de pulso de $90^\circ$ .	8
<b>Figura 3:</b> Ilustração do sinal de excitação para aparelhos de RMN de ondas pulsadas	10
<b>Figura 4:</b> Duas maneiras de visualização do sinal de RMN: a) um espectro de onda (amplitude em função do tempo), b) um espectro de frequência ( amplitude em função da frequência.	11
<b>Figura 5:</b> O efeito de um pulso de $90^\circ$ no vetor de magnetização $M_0$ no sistema de coordenadas giratórias.	13
<b>Figura 6:</b> Processo de relaxação transversal após um pulso de $90^\circ$ .	13
<b>Figura 7:</b> Representação do momento magnético dos núcleos após a aplicação de um pulso de radiofrequência que cause a saturação do sinal	15
<b>Figura 8:</b> Seqüência de ecos de spin. (a) pulso de $90^\circ$ , direciona $M_0$ no eixo y, (b) spins isocromáticos, (c) pulso de $180^\circ$ rotaciona o sistema de spin para o eixo y e causa refocamento do spins isocromáticos, (d) formação do eco no tempo $2t_d$ .	16
<b>Figura 9:</b> Seqüência de pulso para hidrogênio (H) e carbono (C) em experimento de DEPT	17
<b>Figura 10:</b> Seqüência de pulso para um experimento simples de $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY	17
<b>Figura 11:</b> Seqüência de pulso para um experimento de HETCOR.	18
<b>Figura 12:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de óleos vegetais. 1, 2 - $\text{CH}_3$ de grupamentos acila, 3 $-(\text{CH}_2)_n$ de grupamentos acila, 4 - $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ de grupamentos acila, 5 - $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ grupamentos acila, 6- $-\text{OCO}-\text{CH}_2-$ de grupamentos acila, 7- $=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=-$ de grupamentos acila, 8 - $-\text{CH}_2\text{OCOR}$	22

grupamento glicérido, 9 -  $>\text{CHOCOR}$  grupamento glicérido, 10-  $-\text{CH}=\text{CH}-$  grupamento acila.

**Figura 13:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes sucos de frutas, obtidos em um espectrômetro de 600 MHz (0.6-2.4ppm). 23

**Figura 14:** Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (regiões de 2,5 – 5,5 ppm e 0,8 – 2,5 ppm) de diferentes amostras dos sucos, indicando substâncias como ácido málico (MA), sucrose (Suc), frutose (Fru) e glicose (Glc). (a) 5,5 – 2,5 ppm; (b) 2,5 – 0,8 ppm. 24

**Figura 15:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de um suco de laranja puro e de um suco de laranja com a adição de polpa lavada. (a) Região entre 3,0 e 5,4 ppm assinalando os principais açúcares como sacarose (suc), glicose (glc), frutose (fru). (b) Região entre 1,0 e 2,6 ppm assinalando vários aminoácidos como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamina/ácido glutâmico (glx), dimetilprolina (DMP), prolina (Pro), arginina (arg), alanina (ala), tirosina (thr), valina (val), isoleucina (ileu), leucina (leu). 25

**Figura 16:** Espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  de estado sólido apresentando variações de composição de compostos fenólicos em mangas, com tempos de amadurecimento de 3 (a), 9 (b) e 15 dias(c). 26

**Figura 17:** Espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN de estado sólido apresentando variações de concentração de alanina em mangas, com tempos de amadurecimento de 3 (a), 9 (b), 15 (c) e 19 dias (d). 27

**Figura 18:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de suco de tomate da variedade Red Setter.

**Figura 19:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com supressão do sinal da água, do extrato líquido da amostra do tecido da banana obtido em um equipamento de 500 MHz. 28

**Figura 20:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fruta Sapota após 8 meses da floração. (a) sacarose (b) glicose (c) frutose (d) frutose. 29

**Figura 21:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido a 500 MHz de cerveja do tipo Ale.

**Figura 22:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  2D (TOCSY) da cerveja do tipo 30

Ale, apresentada na Figura 21.	31
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de vinho tinto obtido em espectrômetro de 600 MHz (0,4 – 3,6 ppm).	32
<b>Figura 24:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de vinho tinto liofilizado: sem a utilização da supressão dos sinais mais intensos(a) e com a supressão dos sinais mais intensos (b).	33
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de vinho tinto liofilizado utilizado para identificação de aminoácidos.	33
<b>Figura 26:</b> Mapa do mundo com a demarcação das latitudes. Em amarelo escuro estão apresentadas as principais regiões produtoras de vinhos.	38
<b>Figura 27:</b> Ilustração das partes de um cacho de uva.	
<b>Figura 28:</b> Divisões da baga da uva.	42
<b>Figura 29:</b> Vinhedo Chardonnay da Quinta da Neve na região de São Joaquim-SC.	43
<b>Figura 30:</b> Cabernet Sauvignon enxertadas sobre porta-enxerto Paulsen 1103 cultivadas nos vinhedos da Quinta da Neve em São Joaquim.	55
<b>Figura 31:</b> Vinhedo de Cabernet sauvignon, conduzido na forma de manjedora da empresa Videcar.	56
<b>Figura 32:</b> Medida da amplitude do sinal de ruído em um espectro de RMN ( $N_{pp}$ )	57
<b>Figura 33:</b> Gráfico de área do sinal do ácido succínico (singleto em 2,6 ppm) normalizada pelo padrão interno em função da concentração ( $\text{gL}^{-1}$ ) da solução de ácido succínico.	64
<b>Figura 34:</b> Variação da intensidade e área do sinal no espectro de RMN de $^1\text{H}$ para as diferentes soluções analisadas. A, (DL-prolina $16,00\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina $16,00\text{gL}^{-1}$ , ácido málico $40,00\text{gL}^{-1}$ , $\alpha$ -glicose $78,00\text{gL}^{-1}$ , $\beta$ -glicose $42,00\text{gL}^{-1}$ e frutose $120\text{gL}^{-1}$ ; B, (DL-prolina $4,00\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina $4,00\text{gL}^{-1}$ , ácido málico $10,00\text{gL}^{-1}$ , $\alpha$ -glicose $19,50\text{gL}^{-1}$ , $\beta$ -glicose $10,50\text{gL}^{-1}$ e frutose $30\text{gL}^{-1}$ ); C, (DL-	67

prolina  $1,60\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $1,60\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $4,00\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $7,80\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $4,20\text{gL}^{-1}$  e frutose  $12,0\text{gL}^{-1}$ ); D, (DL-prolina  $0,80\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $0,80\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $2,00\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $3,90\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $2,10\text{gL}^{-1}$  e frutose  $6,00\text{gL}^{-1}$ ); E (DL-prolina  $0,16\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $0,16\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $0,40\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $0,78\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $0,42\text{gL}^{-1}$  e frutose  $1,20\text{gL}^{-1}$ ).

**Figura 35:** Gráfico da área do sinal, dubleto em 1,49ppm (alanina) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de alanina. Onde  $A_s$  é a área da substância em análise e  $A_i$  a área do padrão interno (TMSP). 68

**Figura 36:** Gráfico da área do sinal, multipeto em 2,36ppm (prolina) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de prolina. 69

**Figura 37:** Gráfico da área do sinal, dubleto em 4,11ppm (frutose) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de frutose. 69

**Figura 38:** Gráfico da área do sinal, dubleto em 5,23 ppm ( $\alpha$ -glicose) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de  $\alpha$ -glicose. 70

**Figura 39:** Gráfico da área do sinal, duplo dubleto em 3,24 ppm ( $\beta$ -glicose) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de  $\beta$ -glicose. 70

**Figura 40:** Gráfico da área do sinal, duplo dubleto em 2,63 e 2,83ppm (ácido málico) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de ácido málico 71

**Figura 41:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) obtidos com saturação do sinal da água (A), sem saturação do sinal da água (B), de uma solução de  $0,16\text{gL}^{-1}$  de alanina,  $0,16\text{gL}^{-1}$  de prolina e  $0,4\text{gL}^{-1}$  de ácido málico. 77

**Figura 42:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (4,7 Tesla) de diferentes amostras de vinhos brancos brasileiros. 80

**Figura 43:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (4,7 Tesla) de diferentes amostras de vinhos concentradas por liofilização. 81

**Figura 44:** Espectros de RMN de 2D homonuclear COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da amostra A do vinho liofilizado. 82

**Figura 45:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes amostras de vinhos

concentradas através de fluxo de nitrogênio.	85
<b>Figura 46:</b> Confirmação da presença da alanina através de adição do padrão da substância.	86
<b>Figura 47:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de vinho branco uruguaio da casta Chardonnay, sem pré-concentração.	87
<b>Figura 48:</b> Mapa da Serra Catarinense.	
<b>Figura 49:</b> Gráfico de distribuição do comprimento da baga (mm) em função do número percentual de bagas da uva Chardonnay sob o porta-enxerto Paulsen 1103, nos diferentes estágios de desenvolvimento (6, 35, 65, 101 dias após a floração).	88
<b>Figura 50:</b> Cacho de uvas Chardonnay do vinhedo Quinta da Neve em 22/01/2004 (65 dias após a floração)	91
<b>Figura 51:</b> Cacho de uvas Chardonnay do vinhedo Quinta da Neve em 26/02/2004 (101 dias após a floração)	92
<b>Figura 52:</b> Valores médios do grau Brix em função da data de coleta para a uva Chardonnay.	93
<b>Figura 53:</b> Diagrama apresentando o desenvolvimento da uva com intervalo de 10 dias após a floração, indicando as diferenças nas atividades dos sistemas vasculares. Figura adaptada de referência.	94
<b>Figura 54:</b> Valores médios do pH em função das datas de coletas.	
<b>Figura 55:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (9,4 Tesla) da uva Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento	95
<b>Figura 56:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (9,4 Tesla) da região de alto campo (0 – 3,0 ppm) da uva Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento. (6, 35, 65, 101 dias após a floração).	99
<b>Figura 57:</b> Espectro de RMN 2D COSY (H-H) com supressão parcial do sinal da água, para a uva Chardonnay coletada 62 dias após a floração.	101
<b>Figura 58:</b> Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ (9,4 Tesla) das uvas Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento.(6, 35, 65, 101 dias após a floração).	103

<b>Figura 59:</b> Expansão da região de 40 ppm a 90 ppm da Figura 58.	
<b>Figura 60:</b> Espectro de 2D HMBC da uva Chardonnay 35 dias após a data de floração.	104
<b>Figura 61:</b> Espectro de DEPT da uva Chardonnay 65 dias após a floração.	105
<b>Figura 62:</b> Distribuição do tamanho da baga (comprimento em mm) em função do número percentual de bagas para uva Cabernet Sauvignon (Paulsen 1103) cultivada em São Joaquim.	106
<b>Figura 63:</b> Cacho de uvas Chabernet sauvignon do vinhedo Quinta da Neve em 22/01/2004 (56 dias após a floração).	107
<b>Figura 64:</b> Cacho de uvas Chabernet sauvignon do vinhedo Quinta da Neve em 26/02/2004 (91 dias após a floração).	115
<b>Figura 65:</b> Cacho de uvas Chabernet sauvignon do vinhedo Quinta da Neve em 02/04/2004 (127 dias após a floração).	116
<b>Figura 66:</b> Valores de grau Brix médio em função da data de amostragem para a uva Cabernet sauvignon (Paulsen 1103), cultivada em São Joaquim.	117
<b>Figura 67:</b> Valores de pH médio em função das datas de amostragem para a uva Cabernet sauvignon cultivada em São Joaquim.	117
<b>Figura 68:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (9,4 Tesla) da uva Cabernet sauvignon nos diferentes estágios de desenvolvimento (23, 59, 91 e 127 dias após a floração)	118
<b>Figura 69:</b> Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ (9,4 Tesla) da uva Cabernet sauvignon nos diferentes estágios de desenvolvimento (23, 59, 91 e 127 dias após a floração)	119
<b>Figura 70:</b> Gráfico de distribuição do comprimento da baga (mm) em função do número percentual de bagas da uva Cabernet Sauvignon sob porta enxerto 04343 (A) e sob o porta enxerto Paulsen 1103 (B), nas diferentes datas de coleta.	122
<b>Figura 71:</b> Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto 04343 cultivadas nos vinhedos da Empresa Videcar em Videira, 83 dias após floração.	123
<b>Figura 72:</b> Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto 04343 cultivadas nos vinhedos da Empresa Videcar em Videira, 118 dias após floração.	128



<b>Figura 73:</b> Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto Paulsen 1103 cultivadas nos vinhedos da Empresa Videcar em Videira, 83 dias após floração.	129
<b>Figura 74:</b> Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto Paulsen 1103 cultivadas nos vinhedos da Empresa Videcar em Videira, 118 dias após floração.	130
<b>Figura 75:</b> Gráfico do valor do grau Brix médio em função da data de coleta para a uva Cabernet Sauvignon cultivada sob os porta enxertos 04343 (♦) e Paulsen 1103 ( ).	130
<b>Figura 76:</b> Valores do pH médio em função da data de coleta para a uva Cabernet Sauvignon cultivada sob os porta enxertos 04343 (♦) e Paulsen 1103 ( ).	131
<b>Figura 77:</b> pH de viragem observado para a uva Cabernet sauvignon cultivada sob o porta enxerto Paulsen 1103 ( ) e VR 04343 ( ).	132
<b>Figura 78:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet Sauvignon 04343.	133
<b>Figura 79:</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet Sauvignon Paulsen 1103.	135
<b>Figura 80:</b> Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet Sauvignon sob porta enxerto VR 04343.	136
<b>Figura 81:</b> Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet Sauvignon sob porta enxerto Paulsen 1103.	137
	138
	139

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Aspectos sensoriais e composição do engaço	43
<b>Tabela 02:</b> Valores dos tempos de relaxação longitudinal( $T_1$ ) para os hidrogênios a serem monitorados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ .	63
<b>Tabela 03:</b> Valores de área em função do número de transientes (scans) para diferentes medidas do mesmo sinal em 2,6ppm.	64
<b>Tabela 04:</b> Soluções dos diferentes analitos utilizadas nos estudos da relação entre a área do sinal normalizada e a concentração em $\text{gL}^{-1}$	65
<b>Tabela 05:</b> Coeficiente de regressão linear obtido para cada substância de interesse.	68
<b>Tabela 06:</b> Limites de detecção obtidos por espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$ , sem supressão do sinal da água e com supressão, para as substâncias em análise.	73
<b>Tabela 07:</b> Limites de quantificação e precisão das medidas, obtidas em experimentos de RMN de $^1\text{H}$ sem supressão do sinal da água.	73
<b>Tabela 08:</b> Limites de quantificação e precisão das medidas, obtidas em experimentos de RMN de $^1\text{H}$ com supressão do sinal da água.	74
<b>Tabela 09:</b> Validação da metodologia: Valores do fator de recuperação, para os experimentos de RMN de $^1\text{H}$ sem supressão do sinal da água.	75
<b>Tabela 10:</b> Validação da metodologia: Valores do fator de recuperação, para os experimentos de RMN de $^1\text{H}$ com supressão do sinal da água.	75
<b>Tabela 11:</b> Compostos químicos caracterizados nos vinho por análise direta, deslocamentos químicos e multiplicidades.	79
<b>Tabela 12:</b> Compostos químicos caracterizados nos vinho submetidos à concentração por fluxo de nitrogênio, deslocamentos químicos e multiplicidades.	84
<b>Tabela 13:</b> Características físicas da uva Chardonnay cultivada sob o porta enxerto Paulsen 1103 no município de São Joaquim	89

enxerto Paulsen 1103 no município de São Joaquim.

**Tabela 14:** Valores de acidez titulável durante o crescimento da uva Chardonnay sobre o porta enxerto Paulsen 1103. 97

**Tabela 15:** Deslocamento químico ( $^1\text{H}$ ) e multiplicidade dos metabólitos da uva. 100

**Tabela 16:** Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas. 109

**Tabela 17:** Concentrações e recuperação das diferentes substâncias medidas na amostra de suco de uva Chardonnay, 65 dias após a floração. 111

**Tabela 18:** Concentrações e recuperação das diferentes substâncias medidas na amostra de suco de uva Chardonnay, 101 dias após a floração 112

**Tabela 19:** Características físicas da uva Cabernet sauvignon cultivada sob o porta enxerto Paulsen 1103 no município de São Joaquim. 114

**Tabela 20:** Valores de acidez titulável durante o crescimento da uva Cabernet sauvignon sobre o porta enxerto Paulsen 1103 cultivada em São Joaquim. 120

**Tabela 21:** Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas obtidas para a uva Cabernet sauvignon Paulsen 1103 cultivada em São Joaquim. 124

**Tabela 22:** Características físicas da uva Cabernat Sauvignon cultivada sob o porta enxerto 04343 no município de Videira. 127

**Tabela 23:** Características físicas da uva Cabernat Sauvignon cultivada sob o porta enxerto Palsen 1103 no município de Videira. 128

**Tabela 24:** Valores de acidez titulável durante o crescimento da uva Cabernet Sauvignon sobre os porta-enxertos 04343 e Paulsen 1103. 134

**Tabela 25:** Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas obtidos para a uva Cabernet sauvignon sob porta enxerto VR043-43. 140

**Tabela 26:** Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas obtidos para a uva Cabernet sauvignon sob porta enxerto Paulsen 1103. 141

**ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

RMN	Ressonância magnética nuclear
I	Número quântico de spin
FT	Transformada de Fourier
FID	Free induction decay (Decaimento livre de indução)
RF	Radio frequência
DOSY	Diffusion ordered spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
COSY	Correlation Spectroscopy
HETCOR	Heteronuclear chemical shift correlation
HMQC	<sup>1</sup> H-detected heteronuclear multiple-quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple-bond connectivity
NOE	Nuclear overhauser effect
T	Tesla
L	Litros
ì l	Microlitros
g	Gramas
ì g	Microgramas
°C	Graus centígrados
°Brix	Graus Brix
TMSP	Trimetil-silil-propionato de sódio
s	Singleto
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
m	Multiplete
t	Triplete
q	Quarteto
T <sub>1</sub>	Tempo de relaxação longitudinal (spin-rede)
T <sub>2</sub>	Tempo de relaxação transversal (spin-spin)

## RESUMO

Um dos objetivos da química analítica moderna é o desenvolvimento de técnicas capazes de identificar e quantificar diferentes substâncias em matrizes complexas, a fim de servirem como ferramentas para o controle direto da qualidade de produtos e matérias primas. Neste contexto, a utilização da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear tem um grande potencial de aplicação na indústria de alimentos. Este trabalho tem como objetivo principal o estudo da viabilidade da utilização da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em análises qualitativas e quantitativas de uvas e vinhos produzidos no Brasil. Desta maneira foram analisadas diferentes amostras de vinhos brancos brasileiros elaborados a partir de uva Chardonnay cultivada no estado do Rio Grande do Sul por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Foram também analisadas uvas Chardonnay e Cabernet sauvignon cultivadas nos municípios São Joaquim e Videira no estado de Santa Catarina utilizando diferentes tipos de porta enxertos (Paulsen 1103 e VR 043-43). Nos vinhos analisados foi identificada a presença de compostos majoritários como: etanol, glicerol e dos ácidos málico, tartárico, láctico e acético. Nos vinhos concentrados por meio de fluxo de nitrogênio foi ainda possível identificar compostos minoritários como os aminoácidos. A análise das uvas por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  possibilitou a identificação e quantificação de compostos majoritários (ácido málico,  $\alpha$ -glicose,  $\beta$ -glicose e frutose) e minoritários (prolina e alanina) de forma rápida, sem pré-preparo das amostras. A Ressonância Magnética Nuclear demonstrou ser uma metodologia bastante promissora, para o monitoramento da composição química, pois possibilitou a determinação simultânea de vários compostos de maneira rápida e sem destruição da amostra, permitindo verificar variações de composição química de uvas e vinhos associadas às variedades de uvas utilizadas, aos diferentes locais e formas de plantio das uvas e aos métodos de elaboração de vinhos.

## ABSTRACT

The modern analytical chemistry work with the development of techniques to identify and to quantify different substances in complex matrices, for the direct control of the quality of products and raw materials. The use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy has a great potential of application in the food industry. This work presents study about the use of the Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, in qualitative and quantitative analyses of grapes and wines produced in Brazil. Different samples of Brazilian white wines elaborated from Chardonnay grapes cultivated in the state of Rio Grande do Sul had been analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Chardonnay and Cabernet sauvignon grapes cultivated in the cities of Joaquim and Videira in the state of Santa Catarina, using different types of rootstocks (Paulsen 1103 and VR 043-43) had been analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. In the analyzed wines the presence of ethanol, glycerol, and malic, tartaric, lactic and acetic acids was identified. In the wines concentrated by means of nitrogen flow it was still possible to identify minor compounds such as amino acids. The analysis of the grapes by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, permitted the identification and quantification of major compounds (malic acid,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose and fructose) and minor compounds (proline and alanine) with fast sample preparation. The Nuclear Magnetic Resonance demonstrated to be a promising technique, for the rapid control of the chemical composition, it made possible the simultaneous analysis of some composites without sample destruction, allowed to detect variation in chemical composition of grapes and wines related to the grapes, places and forms of cultivation and to the methods of wines elaboration.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.3 Justificativas

O consumo e a produção de vinhos finos elaborados a partir de uvas *Vitis viníferas* tem aumentado significativamente no Brasil. Da mesma forma a busca por melhoria na qualidade destes vinhos é cada vez maior. Os produtores de vinhos investem em tecnologia de maquinários, de processos de fermentação e de envelhecimento da bebida.

Outro ponto de grande importância a ser monitorado na elaboração de vinhos é o controle das substâncias responsáveis pelas propriedades organolépticas (cor, sabor e odor) visto que o valor agregado destes produtos está relacionado às mesmas, diferenciando os vinhos e gerando uma vasta hierarquia de qualidade e preço<sup>1</sup>.

Santa Catarina, estado que tradicionalmente produz vinhos de consumo popular elaborados com uvas americanas, nos últimos anos tem investido em novas tecnologias e na importação de mudas de uvas *Vitis viníferas*, visando a melhoria na qualidade dos seus vinhos. Contudo, pelo fato da cultura de uvas *Vitis viníferas* ser relativamente nova no estado, não se sabe ao certo qual uva se adapta melhor ao território eleito para o seu cultivo.

Atualmente os viticultores estão engajados na escolha das cultivares (tipos de uvas) que melhor se adapte a cada região. As uvas produzidas na região escolhida devem apresentar um alto potencial de qualidade para a elaboração de vinhos finos, traduzindo a expressão da uva cultivada nesta região.

Entre as uvas com maior destaque em comercialização e com fácil adaptação a diferentes tipos de territórios encontra-se a cultivar Cabernet sauvignon, como representante das uvas tintas, e a cultivar Chardonnay, para uvas brancas. Como o plantio de uvas *Vitis viníferas* é relativamente recente no estado, onde as primeiras plantações datam de 1999<sup>2</sup>, não se sabe ao certo quais as características desenvolvidas por estas uvas durante o estágio de crescimento, o que dificulta a avaliação da sua aptidão para a elaboração de vinhos de alta qualidade.



Na prática usual, as uvas são avaliadas em campo através da medição do conteúdo de sólidos totais (indiretamente os açúcares) por índice de refração, cuja medida é dada em escala de °Brix (g/100ml). Assim que a uva alcance um valor superior a 17°Brix, é avaliada a previsão da pluviosidade para época atual e definida a data de colheita.

No entanto, a qualidade da uva para a elaboração de vinhos finos não deve ser avaliada somente pelo seu teor de sólidos totais, mas também por sua composição química geral, que inclui os açúcares, os ácidos, os aminoácidos, os éteres e outras substâncias que têm sua concentração influenciada por um grande número de fatores, como o tipo de porta enxerto utilizado, o modo de condução dos parreirais, o tipo de solo, a localização geográfica do vinhedo, o clima, a produção do vinhedo, entre outros<sup>3</sup>.

No estado de Santa Catarina muito pouco foi estudado sobre a influência desses fatores na composição química da uva a fim de se determinar os melhores locais, métodos de cultura e épocas de colheita para a produção de uvas de alta qualidade física, química e sanitária.

A utilização de novas metodologias no controle de processos e do produto final pode impulsionar um aumento de qualidade dos vinhos brasileiros, melhorando a competitividade frente aos vinhos elaborados por países vizinhos como, Chile, Argentina e Uruguai.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem chamado a atenção dos químicos de alimentos devido ao fato de que procedimentos analíticos mais rápidos, mais potentes e mais limpos estão sendo requeridos para o controle de qualidade nas indústrias e em agências de regulamentação.

A ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  também vem se destacando entre as técnicas inovadoras para a avaliação da maturação de frutas, aonde vem sendo aplicada com sucesso em análise qualitativa e semi-quantitativa permitindo a obtenção de informações químicas de uma grande variedade de compostos de forma rápida e sem destruição da amostra<sup>4-8</sup>.

A espectroscopia de RMN tem sido utilizada no estudo de vinhos, para a determinação qualitativa da composição de aminoácidos e a associação destes com a

localização geográfica<sup>9-14</sup>. Entretanto, a utilização da espectroscopia de RMN na análise de uvas e vinhos produzidos em território brasileiro é quase inexistente.

## 1.4 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral investigar as potencialidades do uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear em equipamentos com campos magnéticos de 4,7 e 9,4 Tesla na análise de vinhos e uvas e sua aplicação como uma ferramenta de controle de qualidade, através da determinação de compostos químicos.

Como objetivos específicos destacam-se:

- Implementar uma metodologia para a análise de vinhos brancos Chardonnay brasileiros por técnicas de RMN de  $^1\text{H}$ .
- Analisar substâncias como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, e outros compostos, especialmente aqueles que estejam envolvidos com a qualidade da bebida por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ .
- Implementar metodologia para a análise por RMN de uvas Chardonnay e Cabernet sauvignon cultivadas nos municípios de São Joaquim e Videira
- Monitorar por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , substâncias como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e outros compostos, especialmente aqueles que estejam envolvidos com a qualidade de uvas *Vitis viníferas*.

- Formar recursos humanos na área de química analítica com capacitação direcionada à viticultura e enologia.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear na análise de alimentos

A utilização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), bem como a versatilidade dos equipamentos tem avançado consideravelmente, desde a primeira identificação de sinais em um espectro em 1945 por Bloch, Purcell e colaboradores. O fenômeno de ressonância magnética nuclear está relacionado com as características intrínsecas dos spins nucleares, e tem possibilitado uma melhor compreensão das propriedades físico-químicas dos núcleos e das moléculas<sup>15</sup>.

As técnicas espectroscópicas, de uma maneira geral, são baseadas no princípio de que as moléculas e átomos podem interagir de diferentes formas com a radiação eletromagnética, revelando informações estruturais e termodinâmicas de forma qualitativa e/ou quantitativa, dependendo da intensidade e do comprimento de onda da radiação utilizada. Os métodos espectroscópicos possibilitam análises rápidas e diretas, podendo detectar vários compostos simultaneamente<sup>16</sup>.

A ressonância magnética nuclear apresenta as características descritas acima, além de permitir uma boa reprodutibilidade na detecção de componentes. Teoricamente, todos os compostos solúveis em uma mistura podem ser determinados quantitativamente, se estes estiverem dentro dos limites de detecção do aparelho de RMN usado (na ordem de partes por milhão)<sup>17</sup>.

A espectroscopia de RMN tem chamado a atenção dos químicos de alimentos devido ao fato de que procedimentos analíticos mais rápidos, mais potentes e mais limpos estão sendo requeridos, para o controle de qualidade, nas indústrias e em agências de regulamentação.

Os alimentos são caracterizados como misturas complexas, que apresentam em sua constituição uma grande variedade de compostos como proteínas, carboidratos, ácidos orgânicos, ésteres, álcoois, ácidos graxos, água, etc.

A RMN de alta resolução tem sido usada como um método não destrutivo na caracterização de alimentos sólidos e líquidos, e na identificação de variações de composição química, fornecendo a “impressão digital” e identificando marcadores

químicos nestas misturas. Técnicas de pulsos e artifícios instrumentais como a supressão de sinais, têm sido utilizados para melhorar a resolução dos espectros e eliminar problemas de sobreposição de sinais nas análises que apresentem espectros complexos.

### 2.1.1 Princípios básicos da ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear está baseada na medida da absorção da radiação eletromagnética na região de radiofrequência (4 – 900 MHz), por um núcleo atômico, com spin diferente de zero, sob a influência de um campo magnético<sup>18</sup>.

A RMN é um fenômeno que pode ser observado em qualquer isótopo que apresente números quânticos de spin,  $I > 0$ . Isto só ocorre com isótopos de números ímpares de prótons e/ou nêutrons. Entre os núcleos com spin diferente de zero, o isótopo do  $^1\text{H}$  é o mais usado na análise de alimentos, devido a sua alta abundância isotópica, de 99,98%. No entanto estudos com  $^{13}\text{C}$  têm despertado um grande interesse, pelo fato de que a pequena abundância isotópica do núcleo  $^{13}\text{C}$  elimina as complicações relacionadas à multiplicidade de sinais originária de acoplamentos  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . Dessa forma, um único sinal de ressonância será observado no espectro para cada carbono presente na amostra<sup>19</sup>.

Sob a influência de um campo magnético externo ( $B_0$ ), um núcleo pode assumir  $2I + 1$  orientações. Logo se considerarmos um núcleo com valor de  $I = \frac{1}{2}$  seu momento magnético ( $\mu$ ) ficará orientado em duas direções possíveis: paralelo ou antiparalelo ao campo magnético (Figura 1). A diferença de energia ( $\Delta E$ ) entre os dois estados é dada pela equação 1, na qual  $\gamma$  e  $h$  representam, respectivamente, a constante giromagnética do núcleo e a constante de Planck.

$$\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi \text{ (Equação 1)}$$

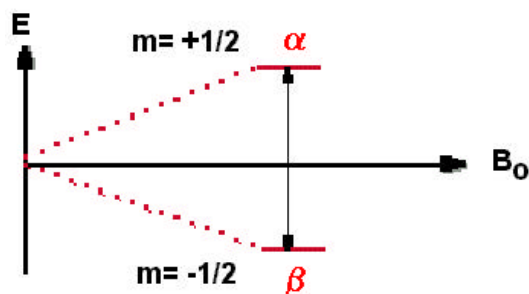


Figura 1: Representação dos níveis de energia para um núcleo com número quântico de spin de  $\frac{1}{2}$  sob a influência de um campo magnético.

As transições entre os estados de energia podem ocorrer por emissão, ou absorção de radiação eletromagnética de frequência  $\nu_0$ . A frequência é obtida através da relação de Bohr, dada pela equação 2.

$$h\nu = \Delta E \text{ (Equação 2)}$$

Substituindo  $\Delta E$  pela intensidade do campo  $B_0$  (Equação 3), observa-se que um núcleo interage com uma radiação eletromagnética na qual a frequência depende efetivamente do campo aplicado e da natureza do núcleo<sup>20</sup>.

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \text{ (Equação 3)}$$

### A origem do sinal em RMN

Quando submetidos à ação de um campo magnético externo, os núcleos apresentam uma distribuição de Boltzman (Equação 4), com a maioria dos núcleos no estado de menor energia ( $m = +1/2$ )

$$N_h/N_l = \exp(-\Delta E/kT) \text{ (Equação 4)}$$

$$N_h/N_l = \exp(-\gamma \hbar B_0 / 2\pi kT) \text{ (Equação 5)}$$

Na equação 4,  $N_h$  e  $N_l$  são respectivamente, o número de núcleos nos estados de energia mais alta e baixa;  $\Delta E$  é a energia de separação entre os núcleos;  $k$  é a constante de Boltzman ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta. Substituindo  $\Delta E$  pela intensidade do campo (Equação 5) constata-se que o número de núcleos no estado de menor energia está diretamente relacionado com a força do campo magnético. Logo, quanto maior for a intensidade do campo magnético externo aplicado, maior será a intensidade do sinal observado nos espectros de RMN<sup>18</sup>.

Para que ocorra o fenômeno de RMN é necessário perturbar o sistema através da aplicação de um pulso de radiofrequência ( $B_1$ ), perpendicular ao campo magnético estático ( $B_0$ ) (Figura 2).

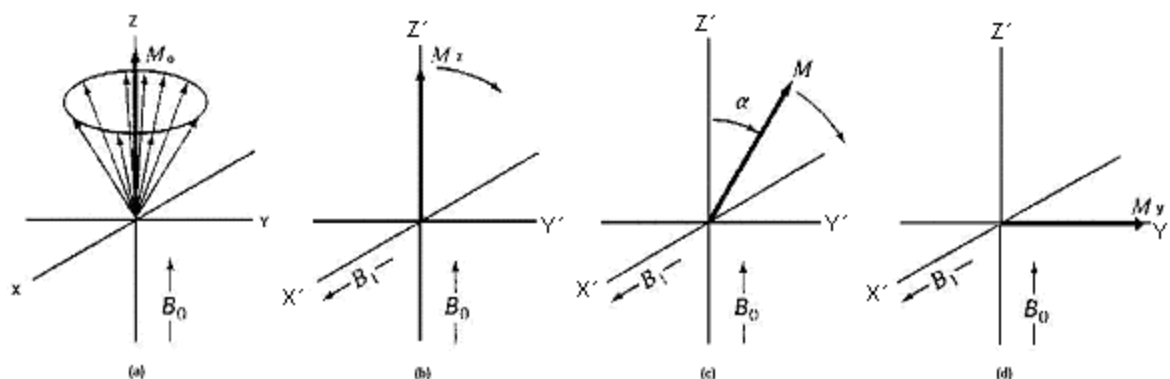


Figura 2: (a) comportamento dos momentos magnéticos dos núcleos no sistema de coordenadas Cartesianas, (b), (c), (d) e coordenadas giratórias em um experimento de pulso de  $90^\circ$ .

O momento magnético dos núcleos é representado por vetores ( $M_0$ ) que apresentam um ângulo  $\alpha$  em relação ao eixo Z. A somatória desses vetores, gera um momento magnético estacionário  $M_z$  alinhado com o eixo  $Z'$ . Quando um núcleo, ou partícula absorve uma energia de radiofrequência (RF) ocorre uma modificação no ângulo  $\alpha$  e, dessa forma o vetor de magnetização será rotacionado, distante do seu estado de equilíbrio (Figura 2).

O ângulo de rotação ( $\alpha$ ) depende do tempo de duração ( $\tau$ ) e da intensidade da radiofrequência ( $B_1$ ) aplicada, conhecida como pulso (Equação 6). Esse é o princípio usado na instrumentação de RMN de alta resolução, que trabalha com sistema de ondas pulsadas. Após a excitação, a amostra voltará gradualmente ao seu estado de equilíbrio inicial, através de uma série de processos chamados de relaxação.

Para obter sinais de intensidade máxima no espectro é necessário que o ângulo de rotação  $\alpha$  seja de  $90^\circ$ .

$$\alpha = \gamma B_1 \tau \text{ (Equação 6)}$$

Tempos de pulso que causem rotações de  $M_0$ , diferentes de  $90^\circ$ , podem ser usados, no entanto, restará alguma magnetização da amostra no eixo z, o que não gera sinal. Apenas as componentes que precessam no eixo x – y são capazes de gerar uma voltagem a ser detectada nas espirais do receptor do aparelho de RMN<sup>21</sup>.

Nos sistemas pulsados (Figura 3), os núcleos sob a influência de um campo magnético externo, são periodicamente submetidos a pulsos de radiação de radiofrequência. A quantidade de energia cedida por tempo para a amostra é constante, no entanto, o tempo de duração de cada pulso é variável. Durante o intervalo de tempo entre cada pulso, um sinal de radiofrequência, no domínio do tempo, chamado de sinal de decaimento livre de indução (FID- free induction decay) é emitido pelos núcleos à medida que eles relaxam e retornam ao seu estado de menor energia ( $m = + \frac{1}{2}$



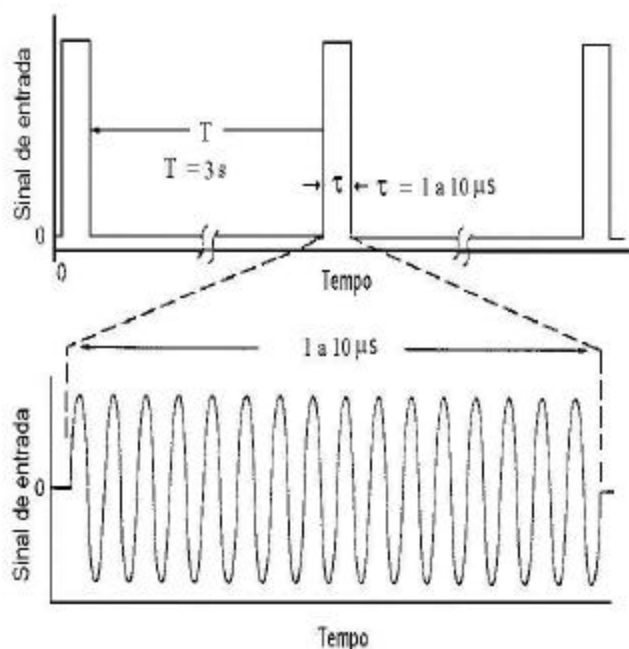


Figura 3: Ilustração do sinal de excitação para aparelhos de RMN de ondas pulsadas<sup>18</sup>.

Nos experimentos de RMN de alta resolução com ondas pulsadas, os sinais de decaimento livres de indução (FID) de vários pulsos podem ser somados (Scans), a fim de obter-se uma melhor relação sinal /ruído e, conseqüentemente, uma melhor resolução do espectro de RMN<sup>22</sup>.

Após ter alcançado um número suficiente de repetições em um experimento, serão obtidas informações sobre todas as freqüências do espectro de RMN, porém de uma forma não familiar e de difícil compreensão, ou seja, um sinal de radiofreqüência no domínio do tempo.

A natureza recíproca do tempo e freqüência sugere que deve haver uma relação direta entre as duas formas de dados (Figura 4), é o caso da Transformada de Fourier (FT), que transforma por uma série de relações matemáticas um sinal de amplitude em relação ao tempo FID, em um sinal de amplitude com relação à freqüência<sup>21</sup>.

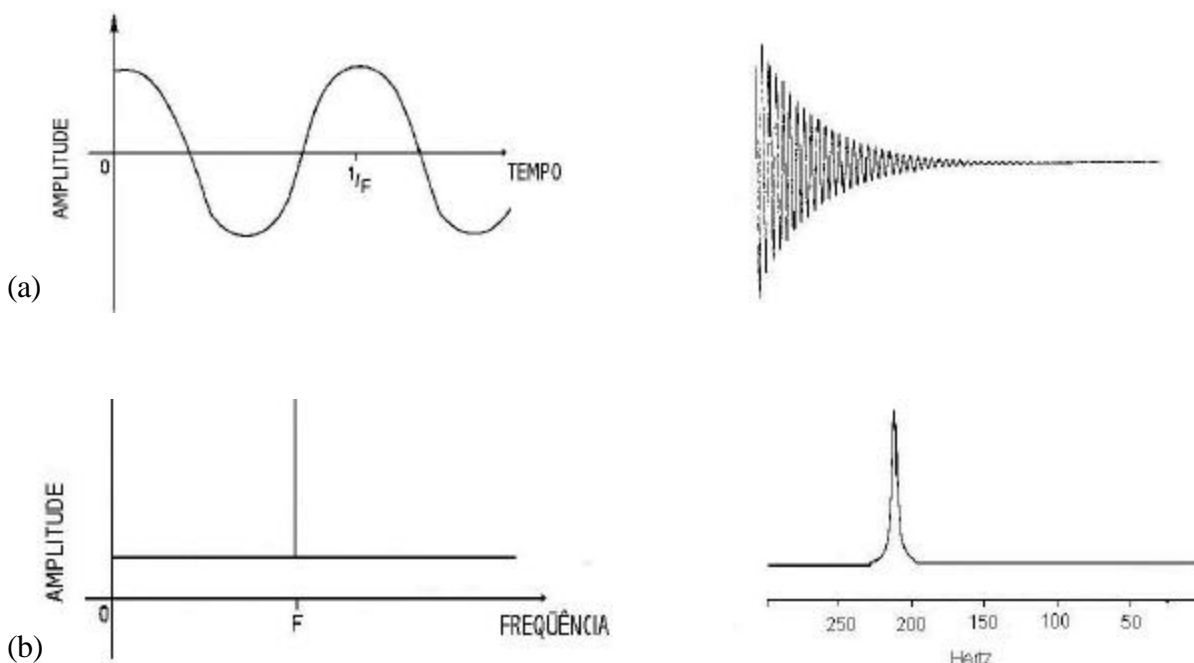


Figura 4: Duas maneiras de visualização do sinal de RMN: a) um espectro de onda (amplitude em função do tempo), b) um espectro de frequência ( amplitude em função da frequência<sup>21</sup>.

### Processos de Relaxação

Após a aplicação de um pulso de R.F., o sistema nuclear de spin apresenta um excesso de energia, a fim de retornar ao estado de equilíbrio térmico o sistema de spin redistribui este excesso de energia através de um processo denominado de relaxação<sup>15</sup>.

O estudo do fenômeno de relaxação, é característico para cada sistema, pois está diretamente correlacionado com as características estruturais das moléculas e possibilita a obtenção de informações detalhadas sobre a estrutura microscópica e dinâmica de uma dada amostra. Desta forma os processos de relaxação possibilitam a criação de experimento de RMN. Na prática, é necessário se ter uma idéia do tempo de relaxação do sistema com o qual se esta trabalhando, para se alcançar uma sensibilidade ótima em qualquer experimento de RMN.

De uma maneira geral existem dois tipos importantes de processos de relaxação em espectroscopia de RMN: relaxação spin-rede ou longitudinal, caracterizada por  $T_1$  e a relaxação spin-spin ou transversal, caracterizada por  $T_2$ <sup>23</sup>. No entanto, mesmo falando em processos de relaxação distintos,  $T_1$  e  $T_2$ , é importante reconhecer que ambos os processos ocorrem simultaneamente, mas dependendo da amostra, em escalas de tempo diferentes<sup>15</sup>.

A condição de equilíbrio é caracterizada por um estado de polarização com uma magnetização ( $M_0$ ) alinhada na direção do campo magnético estático longitudinal ( $B_0$ ). A distribuição do sistema nuclear fora do equilíbrio após um pulso de R.F. origina componentes de magnetização transversal e longitudinal relativa ao vetor de equilíbrio  $M_0$ .

Na relaxação spin-rede, a magnetização no eixo z aumenta até retornar ao seu estado inicial, enquanto que na relaxação spin – spin, os núcleos trocam energia entre spins de modo que alguns precessam mais rapidamente que a frequência de Larmor e outros mais lentamente. Como resultado observa-se um espalhamento de spin no plano x – y que tende a zero na direção do eixo y. No momento em que ocorre o término do processo de relaxação e não existe nenhum componente magnético residual no plano x – y, significa que  $T_2 \leq T_1$ . Normalmente tal fato ocorre em sistemas líquidos e à medida que a viscosidade do sistema vai aumentando os valores de  $T_2$  tendem a aumentar até o ponto em que  $T_2 \geq T_1$  caso freqüente em sistemas sólidos<sup>21</sup>.

**Relaxação Spin – Rede:** A relaxação spin-rede, é um decaimento exponencial de primeira ordem caracterizado por um tempo de relaxação, que é uma medida do tempo médio de vida dos núcleos no estado de maior energia. Neste caso, a perda de energia e conseqüente retorno ao estado de equilíbrio ocorrem através da transferência do excesso de energia do sistema spin para a sua vizinhança. As alterações em  $M_z$  são acompanhadas por um fluxo de energia entre o próprio sistema nuclear de spin e os demais graus de liberdade do sistema, denominada de rede (“lattice” em inglês). Para núcleos com spin de  $\frac{1}{2}$  em solução, a fonte dominante de interação entre os núcleos é a dipolo-dipolo, modulada pela mobilidade molecular, desta forma,  $T_1$  depende da temperatura, viscosidade da solução, do tamanho e da estrutura das moléculas<sup>15</sup>.

A Figura 5 apresenta a representação em coordenadas cartesianas de um processo de relaxação spin-rede após um pulso de  $90^\circ$ .

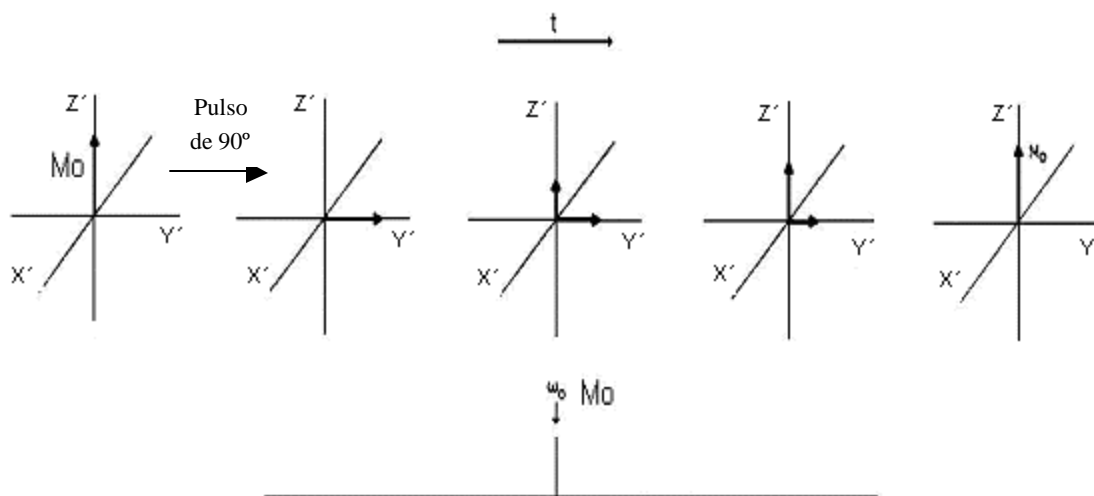


Figure 5: O efeito de um pulso de  $90^\circ$  no vetor de magnetização  $M_0$  no sistema de coordenadas giratórias.

**Relaxação Spin-Spin:** O tempo de relaxação spin-spin ou relaxação transversal é conhecido por  $T_2$ , neste tipo de processo não ocorre uma variação de energia da amostra, não há uma transição entre níveis de energia, mas uma diminuição na quantidade de organização, em outras palavras, a entalpia permanece constante mas a entropia aumenta. O termo transversal sugere que o processo ocorre no eixo  $x - y$  e não envolve necessariamente uma magnetização no eixo  $z$  (Figura 6)<sup>21</sup>.

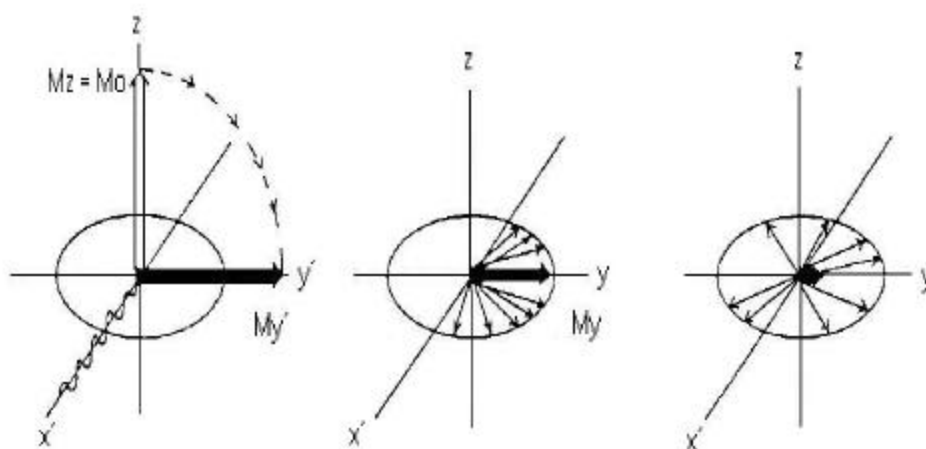


Figura 6: Processo de relaxação transversal após um pulso de  $90^\circ$ .

### 2.1.2 Aplicações práticas dos processos de relaxação

Do ponto de vista prático, os processos de relaxação  $T_1$  e  $T_2$  são de grande importância em vários experimentos de RMN, inclusive na área de alimentos, no entanto sua grande aplicação prática está na área biomédica com o uso da Ressonância Magnética Nuclear de Imagem. É possível através destes experimentos de tempo de relaxação, determinar a proporção de hidrogênios na fase sólida e na fase líquida de um alimento, obter informações sobre as diferentes maneiras com que as moléculas de água estão presentes em um sistema, definir o estado de agregação de proteínas<sup>19</sup> e suprimir sinais de grande intensidade que podem interferir na caracterização de sinais próximos, como picos residuais de solventes<sup>24</sup>.

Em análises quantitativas por RMN é primordial determinar o tempo de relaxação das substâncias que se desejam quantificar, para definir parâmetros experimentais, como o tempo de espera entre pulsos (delay time)<sup>25</sup>.

### Supressão do sinal do solvente por técnica de pré-saturação

A técnica de pré-saturação do sinal do solvente é de grande importância na análise de alimentos. Normalmente, o solvente utilizado é a água, nesse caso, um sinal

de grande intensidade é observado em 4,8ppm, o que pode causar problemas de sobreposição e erros de integração para sinais próximos ao sinal do solvente, pois não é possível ajustar a fase e a linha base de sinais de baixa intensidade.

A pré-saturação baseia-se na aplicação de um pulso diferenciado a um núcleo com uma frequência específica. Um fraco pulso de radiofrequência é aplicado durante um tempo, longo suficiente, para que a relaxação dos núcleos excitados não seja total, gerando desta forma, uma igualdade no número de núcleos nos dois estados de energia. Como resultado, obtém-se o vetor componente  $M_z$  nulo (Figura 7) e nenhum sinal é observado no espectro de RMN.

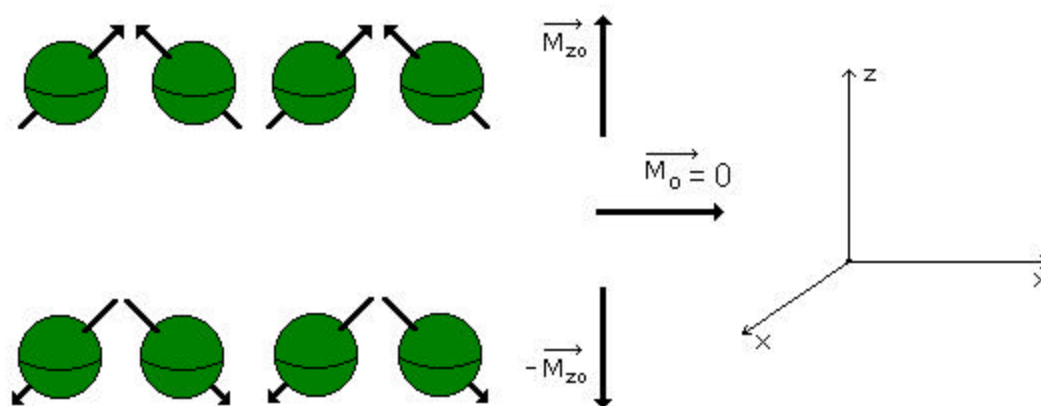


Figura 7: Representação do momento magnético dos núcleos após a aplicação de um pulso de radiofrequência que cause a saturação do sinal.

### Métodos dos ecos de spin

Os ecos de spin foram observados pela primeira vez em 1950 por Hahn, e foram utilizados para medir o tempo de relaxação  $T_2$ . Essa técnica consiste em dois pulsos (um de  $90^\circ$  e um de  $180^\circ$ ), separados por um intervalo de tempo  $T$ . Após o primeiro pulso, aparece um FID. Um eco do sinal de RMN ocorre após o segundo pulso, em um tempo igual à separação entre os pulsos (Figura 8). Tanto a intensidade do FID, quanto à do eco, são proporcionais à concentração de hidrogênios da amostra<sup>26</sup>.

Na técnica de spin eco, o pulso de  $90^\circ$  aplicado ao longo da direção do eixo  $x$  faz com que o vetor de magnetização  $M$  encontre-se no plano  $xy$ . Pode-se considerar  $M$  como a soma das pequenas magnetizações  $M_j$ , cada uma composta do respectivo

conjunto de spins isocromáticos\*, que giram com frequência  $\omega_1$ . Desse modo, a componente  $M_y$ , que coincide com o eixo y tem frequência  $\omega_1 = \omega_0$ . As componentes  $M_y$  que apresentam  $\omega_1 < \omega_0$  estão acima do eixo y e são representados pelo sinal (-), indicando que precessam mais lentamente. As componentes  $M_y$  que apresentam  $\omega_1 > \omega_0$  estão abaixo do eixo y e são representadas pelo sinal (+) conforme a ilustração da Figura 8.

Após o tempo  $\tau$ , um pulso de  $180^\circ$  é aplicado e os spins isocromáticos são rotacionados  $180^\circ$ , permanecendo no plano xy. Como resultado, ocorre o refocamento de todos os spins isocromáticos no tempo  $2\tau$ . Nesse momento, um sinal de eco é formado e a amplitude do eco depende do número de hidrogênio e da sua velocidade de relaxação,  $R_2$  ( $T_2 = 1/R_2$ )<sup>15</sup>.

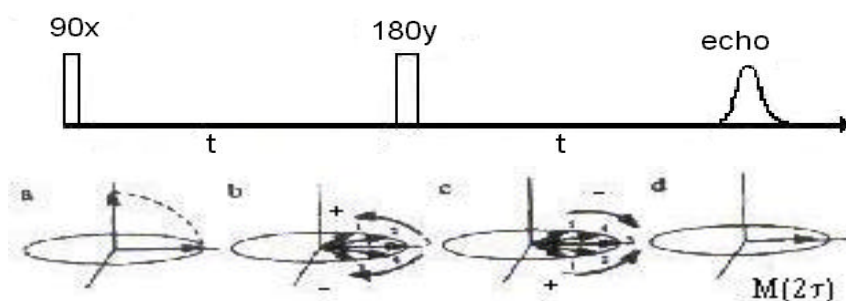


Figura 8: Seqüência de ecos de spin. (a) pulso de  $90^\circ$ , direciona  $M_0$  no eixo y, (b) spins isocromáticos, (c) pulso de  $180^\circ$  rotaciona o sistema de spin para o eixo y e causa refocamento do spins isocromáticos, (d) formação do eco no tempo  $2\tau$ .

Em 1992, Morris e Johnson desenvolveram a técnica de pulso de DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) que utiliza a metodologia dos ecos de spin com gradientes de campos magnéticos pulsados (PFSGE). Através dessa técnica, é possível separar componentes de uma mistura complexa, baseando-se no coeficiente de difusão das substâncias. Os espectros são obtidos a partir da medida de uma série de ecos de spin em diferentes intensidades de campo<sup>26</sup>.

\* spin isocromático: Devido a não homogeneização do campo  $B_0$  na amostra, existe um conjunto de spins de frequência maiores e menores que  $\omega_0$ . Spins com a mesma frequência de Larmor são denominados de spins isocromáticos.

## Técnicas de DEPT, COSY, HETCOR

Os experimentos de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), COSY (Correlation Spectroscopy) e HETCOR (Heteronuclear Chemical Shift Corelation), são baseados em diferentes seqüências de pulsos (Figuras 9, 10, 11) e são usados para confirmação dos sistemas de spins, identificados em espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Os experimentos de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), são conduzidos através da variação da duração do terceiro pulso ( $\theta$ ) para os  $^1\text{H}$  a  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  e  $135^\circ$ . Quando  $\theta = 45^\circ$ , todos os carbonos, com exceção dos carbonos quaternários, estão na fase positiva do espectro. Se,  $\theta = 90^\circ$ , apenas CH estão na fase positiva do espectro, no entanto, quando  $\theta = 135^\circ$ , CH e  $\text{CH}_3$  estão na fase positiva do espectro e  $\text{CH}_2$  na fase negativa<sup>27</sup>.

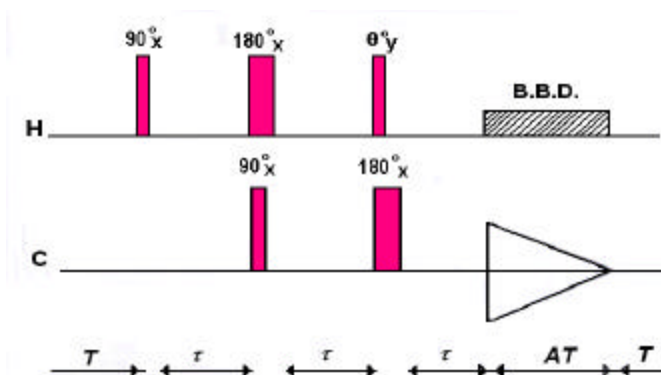


Figura 9: Seqüência de pulso para hidrogênio (H) e carbono (C) em experimento de DEPT<sup>27</sup>.

A espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) é uma técnica usada freqüentemente em experimentos de 2D-FT RMN. O COSY (Correlation Spectroscopy) é o experimento de 2D RMN mais simples e deve ser referido como  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY de modo a indicar claramente, o que está sendo correlacionado. A seqüência de pulsos utilizada para  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY é de dois pulsos de  $90^\circ$  ( $\pi/2$ ) para hidrogênio, separado por um período de evolução,  $t_1$ . O tempo de aquisição é denominado  $t_2$ , conforme a representação da Figura 10.



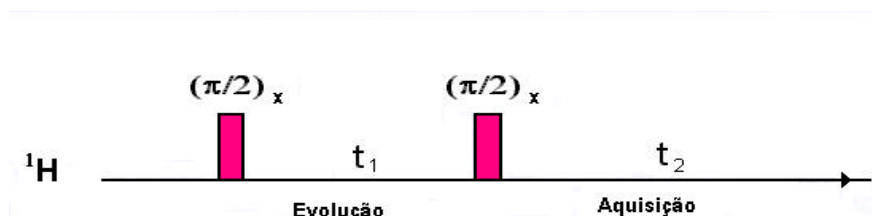


Figura 10: Seqüência de pulso para um experimento simples de  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY

O experimento de  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  COSY correlaciona  $^{13}\text{C}$  núcleos com os  $^1\text{H}$  diretamente ligados ao carbono, ou seja, com acoplamentos distantes de apenas uma ligação, ( $^1J_{\text{CH}}$ ). A seqüência de pulsos para esse experimento, comumente chamada de HETCOR (Heteronuclear chemical shift correlation) está representado na Figura 11. O eixo F1 ( $\nu_1$ ), é derivado do tempo de espera  $t_1$ , que é o eixo do hidrogênio. O eixo F2 ( $\nu_2$ ) obtido durante o tempo  $t_2$  é o eixo do carbono. Com isso o pulso de  $90^\circ$  ( $\pi/2$ ) é detectado no canal  $^{13}\text{C}$  e o FID, é adquirido durante o tempo  $t_2$ <sup>27</sup>.

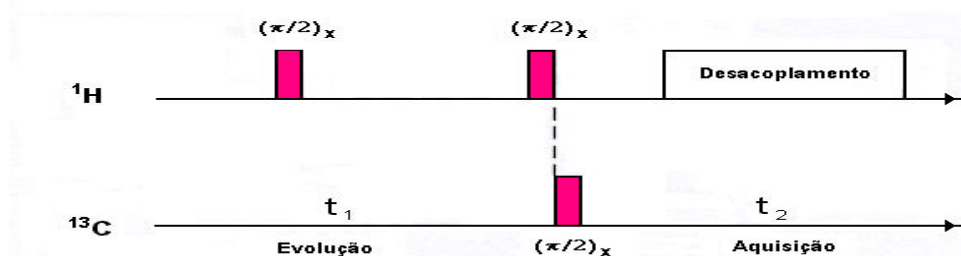


Figura 11: Seqüência de pulso para um experimento de HETCOR<sup>27</sup>.

### Ressonância magnética de 2D com detecção inversa

A baixa sensibilidade e abundância isotópica de heteronúcleos ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) utilizados em experimentos de Correlação Heteronuclear de RMN 2D por detecção direta (HETCOR)<sup>20</sup>, levou ao desenvolvimento de técnicas de pulso 2D heteronucleares onde a detecção é feita a partir do núcleo mais sensível ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) através de detecção indireta. As seqüências de pulsos envolvem transições múltiplo-quânticas denominadas de HMQC ( $^1\text{H}$ -detected Heteronuclear Multiple-quantum Coherence) e HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity). Através desta metodologia, a

sensibilidade dos núcleos aumenta na ordem de  $(\gamma_H/\gamma_X)^3$  na qual  $\gamma_H$  e  $\gamma_X$  são as razões giromagnéticas do hidrogênio e do núcleo X, respectivamente.

### 2.1.3 Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alto campo na análise de alimentos líquidos e sólidos.

O primeiro aparelho de RMN de alta resolução foi comercializado pela Varian Associates em 1953. Desde então, a utilização da espectroscopia de RMN tem obtido um grande espaço nas áreas de química orgânica, inorgânica e bioquímica. A instrumentação de RMN de alta resolução trabalha com frequências acima de 100 MHz, ou campos magnéticos superiores a 2,35 Tesla.

O uso da RMN de alta resolução no estudo da composição dos alimentos, teve início em meados da década de 80 para a análise de leite e sucos de frutas. A RMN tem sido usada de maneira crescente para obtenção de informações sobre os aspectos físico-químicos dos alimentos<sup>28</sup>. Seu uso vai desde a caracterização de compostos de pequeno peso molecular, até a elucidação de estruturas e conformações de moléculas altamente complexas como proteínas e peptídeos, sendo esta, uma ferramenta capaz de fornecer informações tanto em escala macroscópica, quanto em escala microscópica.

#### **Análise de leite e derivados**

Um dos primeiros trabalhos relatados na literatura, escrito por Thomas Eads e Robert Bryant em 1986, trata do uso da espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  para a análise de leite, suco de laranja e suco de maçã. Nesse trabalho os pesquisadores analisam diferentes modos de supressão do sinal da água nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , a fim de eliminar os problemas de sobreposição de sinais nessa região (4,7 ppm), o que possibilitou a identificação de lactose (3,2 a 5,0 ppm) e dos hidrogênios alifáticos das moléculas de gordura (0,5 a 2,0 ppm) em amostras de leite de vaca<sup>24</sup>.

Outros estudos, em 1999, descrevem o uso da técnica de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  como uma ferramenta qualitativa e quantitativa na determinação da composição de

lipídeos na gordura do leite e no fornecimento de dados sobre a fração molar relativa dos ácidos oleico, palmítico, butírico e de triacilglicerídeos. A RMN de  $^{31}\text{P}$  foi aplicada na análise de leite e em frações de leite, possibilitando a identificação simultânea de fosfolipídeos, carboidratos fosforilados e fosfato inorgânico<sup>29</sup>.

Recentemente, a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi utilizada para a detecção de novos compostos e análise da forma em que esses se encontram nas amostras de leite, que não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento. Experimentos de 2D RMN ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ ), foram usados para confirmação dos sinais observados nos espectros de 1D RMN<sup>30</sup>.

### **Análise de café e chá**

Os grãos de café são obtidos da planta da família Rubiácea do gênero *coffea*, as espécies *Arábica* e *Canephora* variante *Robusta* são as espécies que representam 90% e 9% da produção mundial, respectivamente. Os grãos de *Arábica* possuem maior valor comercial pois dão origem a uma bebida com características organolépticas superiores, enquanto os grãos de *Robusta*, são usados em misturas de cafés e na elaboração de cafés solúveis, por apresentarem um alto teor de sólidos totais.

Os cafés elaborados por mistura de grãos dessas espécies têm características de sabor e aroma específicos para cada bebida. A composição química dos pós de cafés varia de produtor para produtor, em função da mistura de grãos<sup>31</sup>.

A natureza empírica da mistura de grãos de café faz com que técnicas de controle de qualidade dessa bebida sejam necessárias. Dessa forma, a Ressonância Magnética Nuclear tem sido uma ferramenta útil na análise de diferentes amostras de cafés instantâneos. Análises de RMN de  $^1\text{H}$  associadas a métodos estatísticos, possibilitam a distinção de amostras de cafés oriundas de diferentes produtores, bem como a identificação de diferenças entre café de um mesmo produtor, que apresentam variações de processamento e de mistura de grãos<sup>32,33</sup>.

Os melhores cafés são obtidos a partir de grãos da espécie *Arábica*, que apresentam um alto valor comercial o que pode induzir à fraudes em alguns produtos, através da mistura de grãos de outras espécies. Estudos sobre espectroscopia de

RMN de  $^1\text{H}$  associada à quimiometria vêm demonstrando a viabilidade dessas técnicas para distinguir espécies diferentes de grão, em misturas de cafés.

A análise de cafés elaborados com grãos das espécies *Arábica* e *Robusta* com diferentes graus de torrefação, preparados em uma máquina padrão de café expresso e em uma cafeteira Moka, foi conduzida por RMN de  $^1\text{H}$ . Os resultados mostram que a técnica de RMN possibilita a distinção de bebidas obtidas a partir de diferentes espécies de grãos, bem como a observação de variações na composição química dessa bebida, em função do grau de torrefação do grão<sup>34</sup>.

O chá é outra bebida mundialmente consumida. De uma maneira geral, existem três tipos de chás: verde (não fermentado), oolong (semi fermentado) e o preto (fermentado). Estudos de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados em extratos de 191 amostras de chá verde de diferentes origens geográficas (China, Japão, Vietinã, Índia, Indonésia e Bangladesh) identificando simultaneamente, aminoácidos, catequinas, ácido orgânicos, polifenóis, ácido graxos e açúcares. Nesse trabalho a associação da quimiometria e análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  possibilitaram a separação das amostras, de acordo com a origem geográfica e a identificação de marcadores químicos de qualidade<sup>35</sup>.

### **Análise de óleos comestíveis de origem vegetal**

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem apresentado um importante papel no estudo da capacidade oxidativa, adulteração e origem geográfica de óleos comestíveis de origem vegetal.

Os primeiros estudos foram realizados a fim de monitorar a capacidade oxidativa de óleos comestíveis de origem vegetal através de sinais referentes aos diferentes ácidos graxos e o acompanhamento do surgimento de sinais referentes aos produtos oxidativos primários (hidroperóxidos) e secundários (aldeídos, alcóois e cetona) em espectros de RMN de  $^1\text{H}$ <sup>36</sup>.

Estudos comparativos da capacidade oxidativa de óleos de canola e óleos de soja foram conduzidos por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  através da observação de sinais de hidrogênios alifáticos, olefínicos e dialilmetilênicos e estudada a variação na

razão entre os prótons alifáticos e olefínicos e a razão entre os prótons alifáticos e dialilmetilênicos e desta maneira avaliada as variações do perfil dos ácidos graxos dos óleos estudados<sup>37</sup>.

A distinção de óleos originários de diferentes fontes vegetais (azeitonas, girassol e soja) tem sido realizada através de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  como mostra a Figura 12<sup>3</sup>

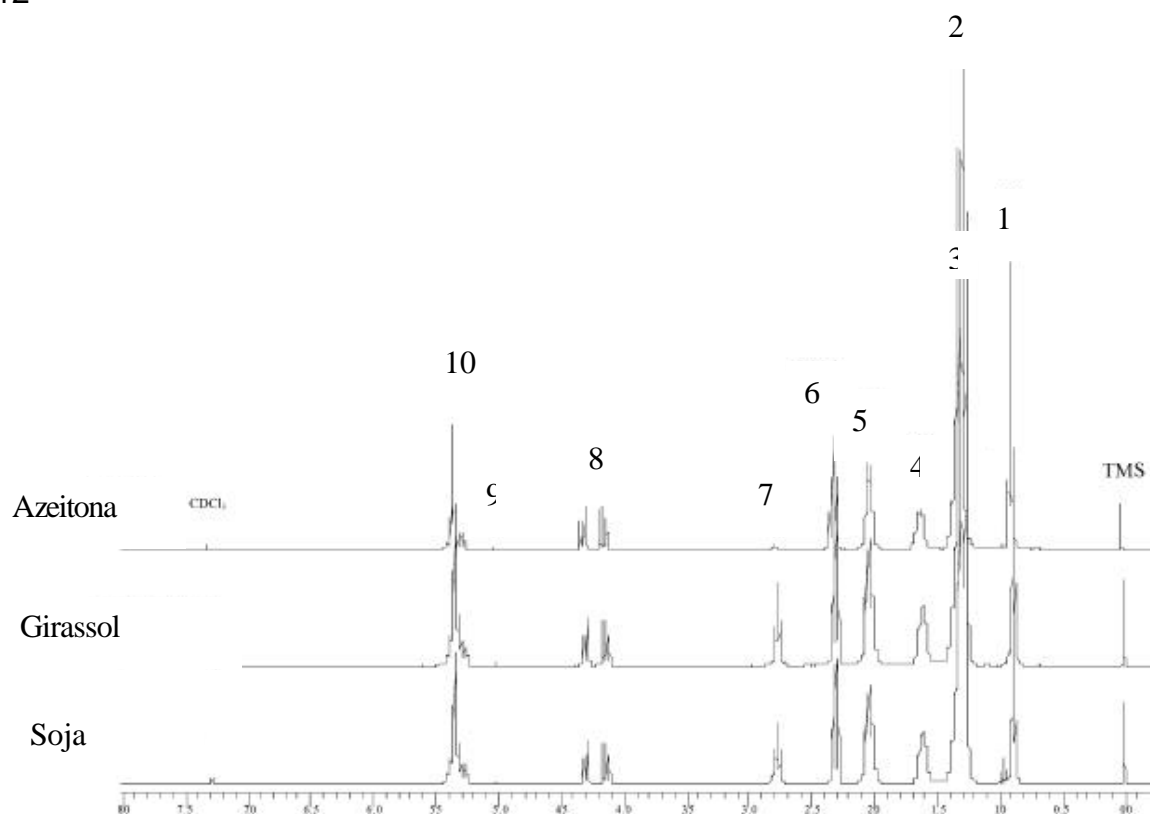


Figura 12: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de óleos vegetais. 1, 2 -  $\text{CH}_3$  de grupamentos acila, 3 -  $(\text{CH}_2)_n$  de grupamentos acila, 4 -  $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  de grupamentos acila, 5 -  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$  grupamentos acila, 6-  $-\text{OCO}-\text{CH}_2-$  de grupamentos acila, 7-  $=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$  de grupamentos acila, 8 -  $-\text{CH}_2\text{OCOR}$  grupamento glicerídeo, 9 -  $-\text{CHOCOR}$  grupamento glicerídeo, 10-  $-\text{CH}=\text{CH}-$  grupamento acila<sup>38</sup>.

Atualmente grande parte dos estudos de óleos vegetais utilizando a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão sendo realizados para a determinação da autenticidade, adulteração e origem geográfica de óleos de olivas<sup>39,40</sup>.

## Análise de sucos de frutas

A utilização de espectrômetros de alto campo magnético (600 e 750 MHz) no controle de qualidade e na determinação da origem de alimentos líquidos como suco de frutas e vinagre, possibilitou a obtenção de espectros de alta resolução, revelando informações sobre um grande número de compostos ( $>10^3$ )<sup>17</sup>. A Figura 13 apresenta os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes sucos de frutas, obtidos através do acúmulo de 128 ou 256 varreduras em um espectrômetro de 600 MHz. Nesse estudo os espectros foram adquiridos entre 7 e 14 minutos e vários compostos com concentrações na ordem de micromol por mililitro foram observados.

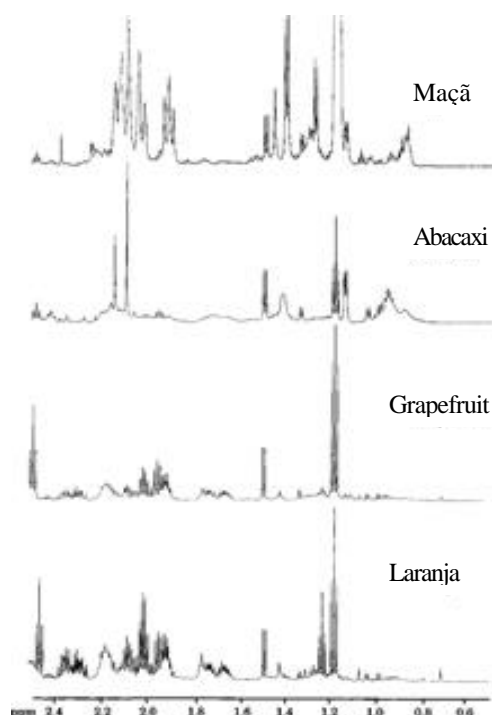


Figura 13: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes sucos de frutas, obtidos em um espectrômetro de 600 MHz (0,6 - 2,4ppm)<sup>17</sup>.

A espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  de alta resolução quando associada a estudos de quimiometria, como métodos estatísticos de multivariância, tem sido uma ferramenta

para muitos químicos de alimentos e para laboratórios de regulamentação, na detecção de fraudes ou alterações em sucos de frutas.

Trabalhos foram realizados com intuito de determinar dados que comprovem fraudes ou adulterações em suco de maçã, onde estudo de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) com diferentes amostras, revelou diferenças tanto na composição majoritária, quanto na minoritária, entre sucos de maçãs elaborados a partir de diferentes espécies (Figura 14)<sup>41</sup>.

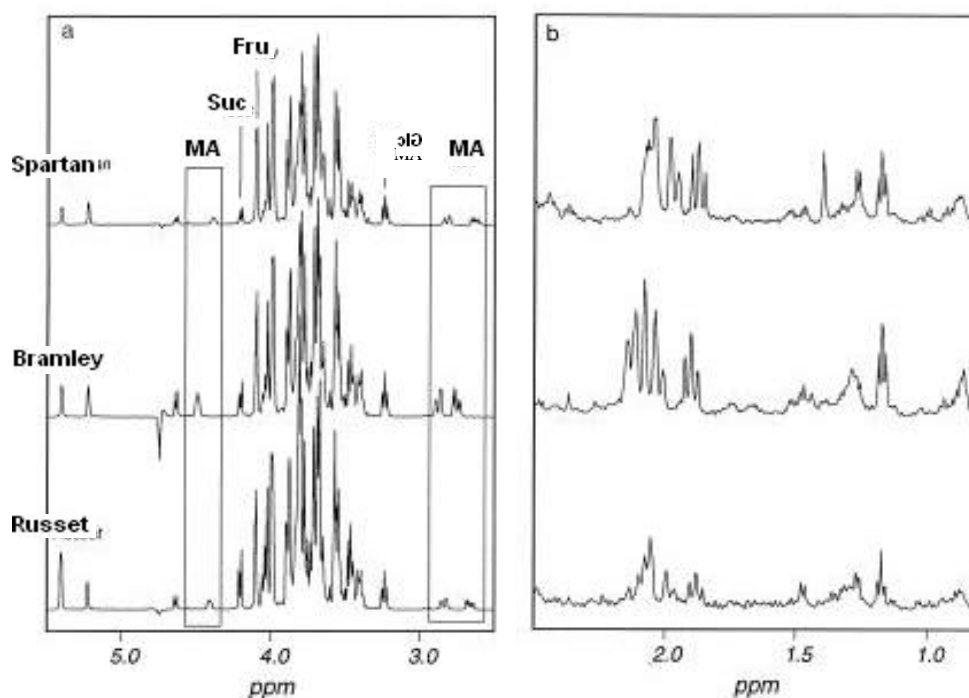


Figura 14: Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (regiões de 2,5 – 5,5 ppm e 0,8 – 2,5 ppm) de diferentes amostras dos sucos, indicando substâncias como ácido málico (MA), sucrose (Suc), frutose (Fru) e glicose (Glc). (a) 5,5 – 2,5 ppm; (b) 2,5 – 0,8 ppm<sup>41</sup>.

As principais adulterações existentes em sucos de laranja são realizadas através da adição de água, de açúcar, de polpa lavada ou de outros sucos de frutas cítricas.

A composição química da polpa lavada é semelhante à do suco de laranja, no entanto, os produtos elaborados com sua adição apresentam um gosto amargo e conseqüente perda de qualidade. Estudos de diferentes sucos de laranja através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  associada à quimiometria, possibilitaram a identificação de sucos adulterados com a adição de polpa lavada<sup>42,43</sup>. A Figura 15 mostra os

espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500MHz) de um suco de laranja puro e de um suco de laranja com a adição de polpa lavada, assinalando a presença de vários aminoácidos e açúcares em diferentes proporções<sup>42</sup>.

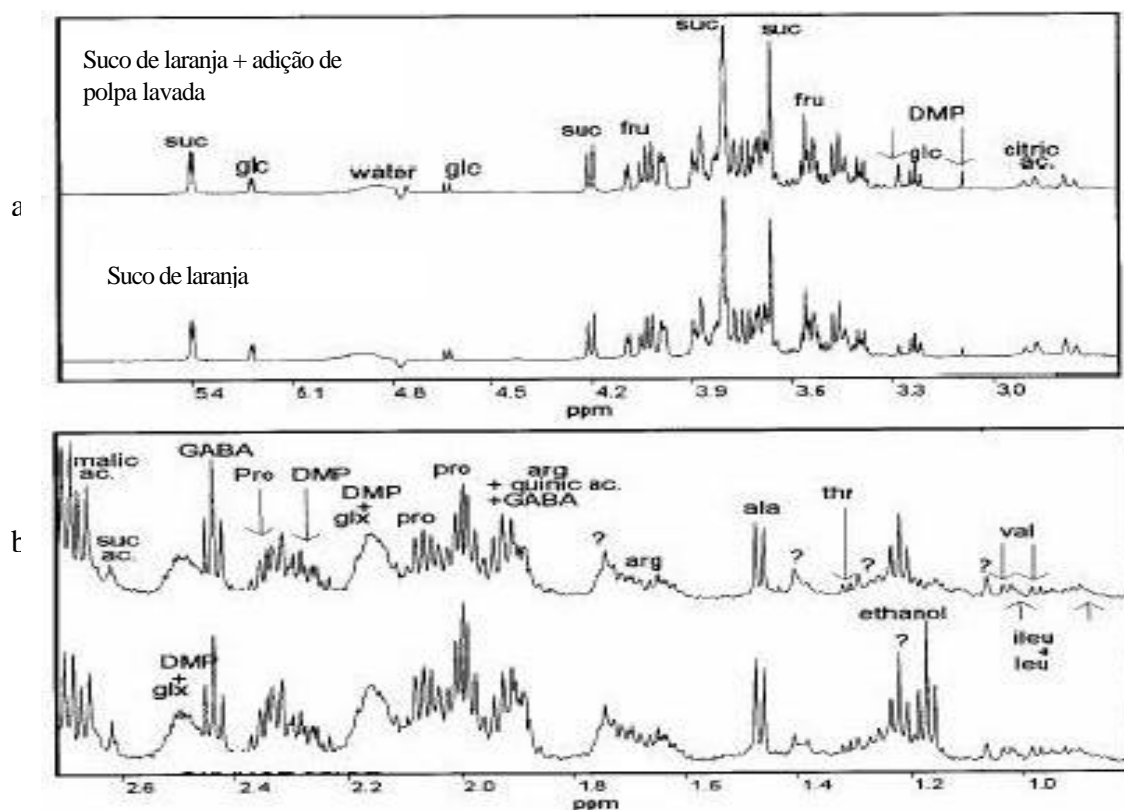


Figura 15: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de um suco de laranja puro e de um suco de laranja com a adição de polpa lavada. (a) Região entre 3,0 e 5,4 ppm assinalando os principais açúcares como sacarose (suc), glicose (glc), frutose (fru). (b) Região entre 1,0 e 2,6 ppm assinalando vários aminoácidos como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamina/ácido glutâmico (glx), dimetilprolina (DMP), prolina (Pro), arginina (arg), alanina (ala), tirosina (thr), valina (val), isoleucina (ileu), leucina (leu)<sup>42</sup>.

## Análise de frutas

A espectroscopia de RMN de estado sólido foi aplicada com sucesso para acompanhar o amadurecimento da manga através do monitoramento de marcadores



químicos nela encontrados, os quais apresentaram aumento ou diminuição de concentração durante o ciclo evolutivo e bioquímico dessa fruta. Nas Figuras 16 e 17 são apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da manga em diferentes fases de amadurecimento em que são detectadas variações de composição química<sup>6</sup>.

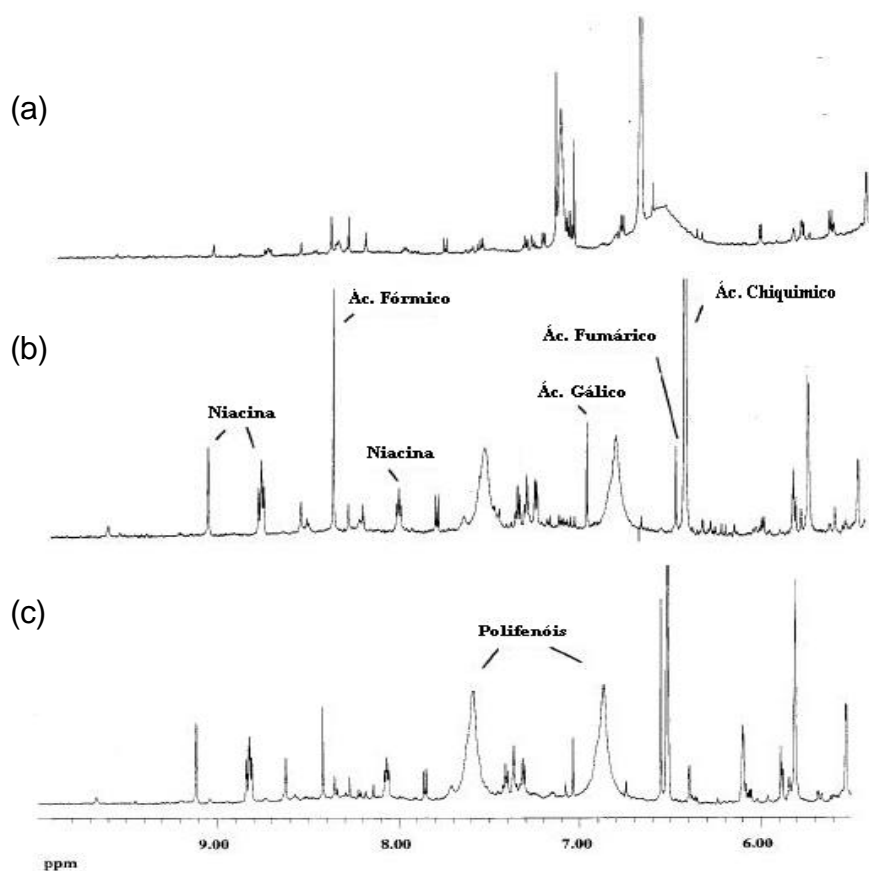


Figura 16: Espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  de estado sólido apresentando variações de composição de compostos fenólicos em mangas, com tempos de amadurecimento de 3 (a), 9 (b) e 15 dias(c)<sup>6</sup>.

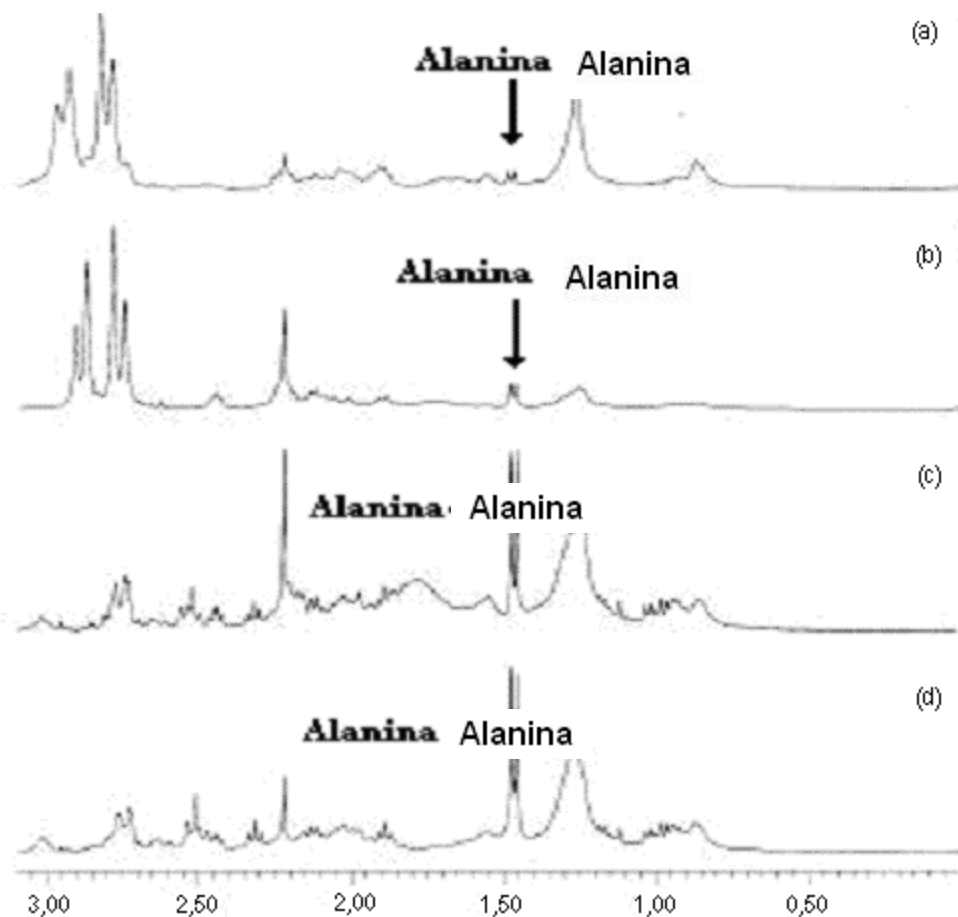


Figura 17: Espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN de estado sólido apresentando variações de concentração de alanina em mangas, com tempos de amadurecimento de 3 (a), 9 (b), 15 (c) e 19 dias(d)<sup>6</sup>.

Análises qualitativas e quantitativas de sucos de tomate e da fruta intacta, por RMN  $^1\text{H}$  600 MHz (Figura 18) possibilitaram a distinção de diferentes cultivares, através de variações na composição majoritária e minoritária dessa fruta<sup>44</sup>.

Os ciclos bioquímicos de frutas tropicais como da Sapota<sup>45</sup> e da Banana<sup>8</sup> foram estudados através do acompanhamento das variações da composição química dessas frutas durante seu amadurecimento por espectroscopia de ressonância magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , respectivamente (Figuras 19 e 20). No estudo realizado com as bananas, a mobilidade da água em diferentes regiões das frutas durante o amadurecimento foi acompanhada através de medidas de coeficiente de difusão via experimentos de tempo de relaxação.

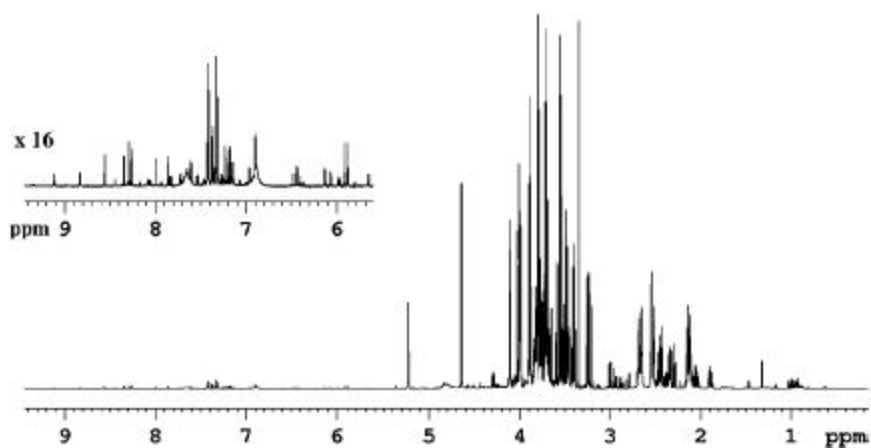


Figura 18: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de suco de tomate da variedade Red Setter<sup>44</sup>.

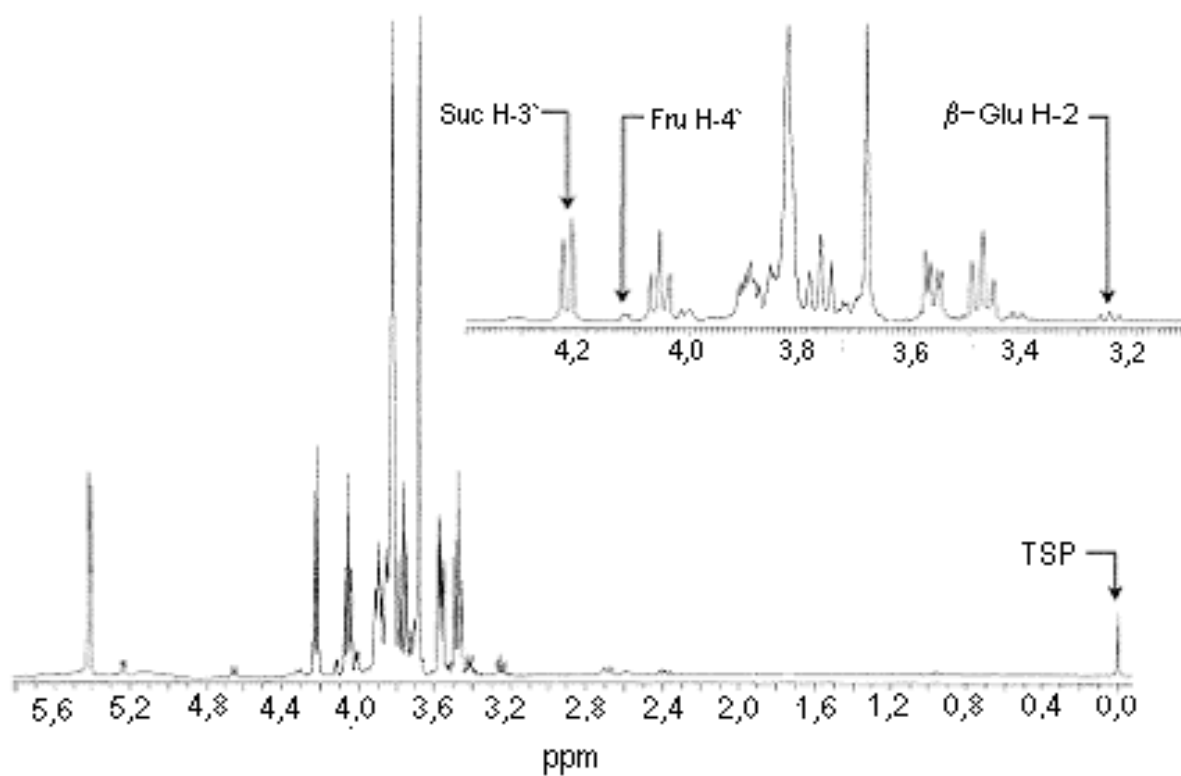


Figura 19: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com supressão do sinal da água, do extrato líquido da amostra do tecido da banana obtido em um equipamento de 500 MHz<sup>8</sup>.

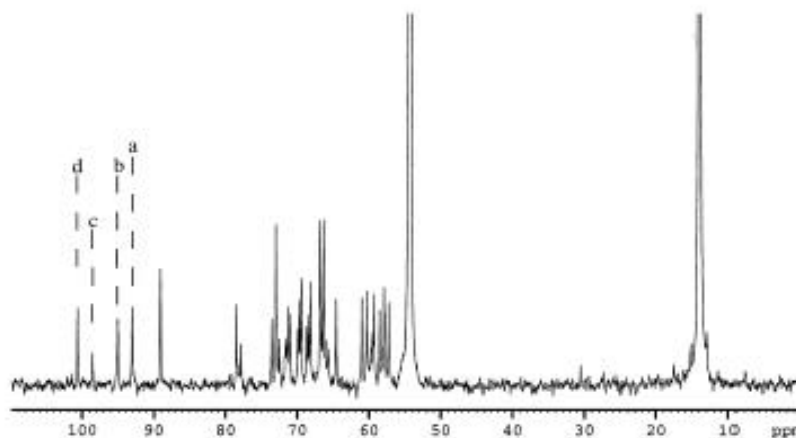


Figura 20: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fruta Sapota após 8 meses da floração. (a) sacarose (b) glicose (c) frutose (d) frutose<sup>45</sup>.

Ameixas frescas foram analisadas por RMN(200MHz) durante seu período de crescimento e amadurecimento. Os espectros obtidos foram relacionados com análises sensorial de firmeza e com medidas de sólidos solúveis obtidos por métodos convencionais (baseados no índice de refração) que são realizados de forma destrutiva. Os resultados obtidos nesse estudo revelam uma boa correlação ( $r = 0,907$ ) entre as medidas realizadas por RMN e pelos métodos convencionais, com uma grande vantagem para a análise de RMN, pois essas medidas foram obtidas de forma rápida (um segundo por fruta)<sup>46</sup>.

Estudos quantitativos da composição de sólidos totais e da estrutura do interior de frutas como uvas, kiwi<sup>47</sup> e laranja<sup>48</sup> foram realizados por Ressonância Magnética de Imagem como uma análise não destrutiva, rápida e eficiente.

### **Análise de bebidas fermentadas: cerveja e vinho.**

A determinação da composição química da cerveja é um fator primordial para o estabelecimento da qualidade e o desenvolvimento de novos produtos. Estudos de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  têm sido conduzidos a fim de determinar de maneira rápida a composição majoritária e minoritária de cervejas, bem como diferenciar tipos de cervejas (ale e lager) através de alterações na composição química<sup>49</sup>.

Na Figura 21 são mostrados os espectros mono-dimensionais (1D) RMN de  $^1\text{H}$  que foram obtidos em espectrômetros de 500 MHz usando uma sequência de pulso baseada em experimentos de efeito Nuclear Overhauser 2D (NOE), com pulso de  $90^\circ$  a  $8,5\ \mu\text{s}$  (128 varreduras).

Devido a alta complexidade dos espectros, experimentos bi-dimensionais (2D) de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 22) e estudos de quimiometria foram realizados, possibilitando a identificação de álcoois (propanol, isobutanol e isopentanol), ácidos orgânicos alifáticos (ácido cítrico, ácido pirúvico e ácido acético), aminoácidos (alanina, prolina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico) e carboidratos.

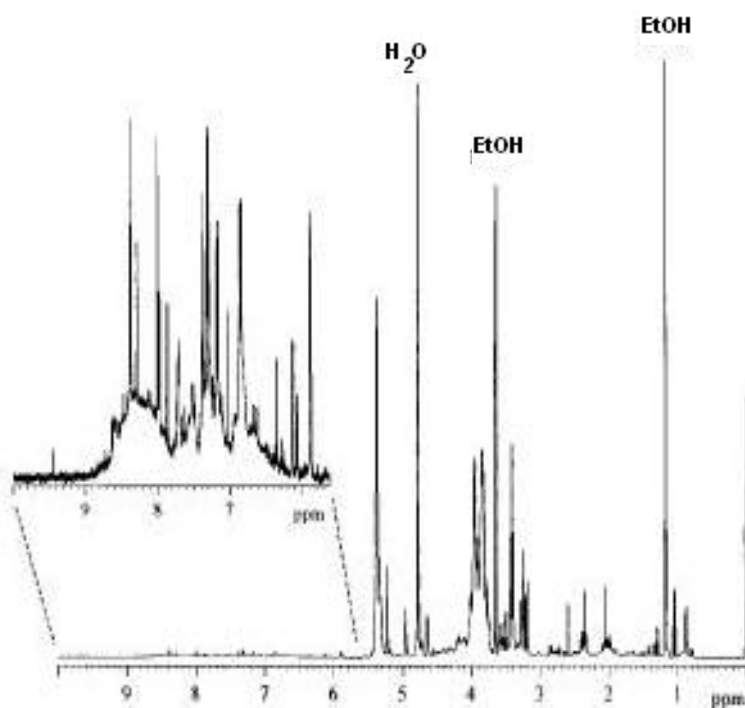


Figura 21: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido a 500 MHz de cerveja do tipo Ale<sup>49</sup>.

Um equipamento capaz de acoplar simultaneamente três técnicas de separação e análise (RMN, HPLC e espectrometria de massa) (LC-NMR/MS) foi usado em estudos de cervejas com o objetivo de suprimir as dificuldades de sobreposição de sinais, encontradas nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de alta resolução, especialmente na região dos açúcares e compostos fenólicos<sup>50</sup>.

Recentemente, técnicas de DOSY são aplicadas à análise de cervejas para a caracterização de substâncias presentes em baixas concentrações cujos sinais, encontram-se encobertos pelos sinais de grande intensidade<sup>51</sup>.

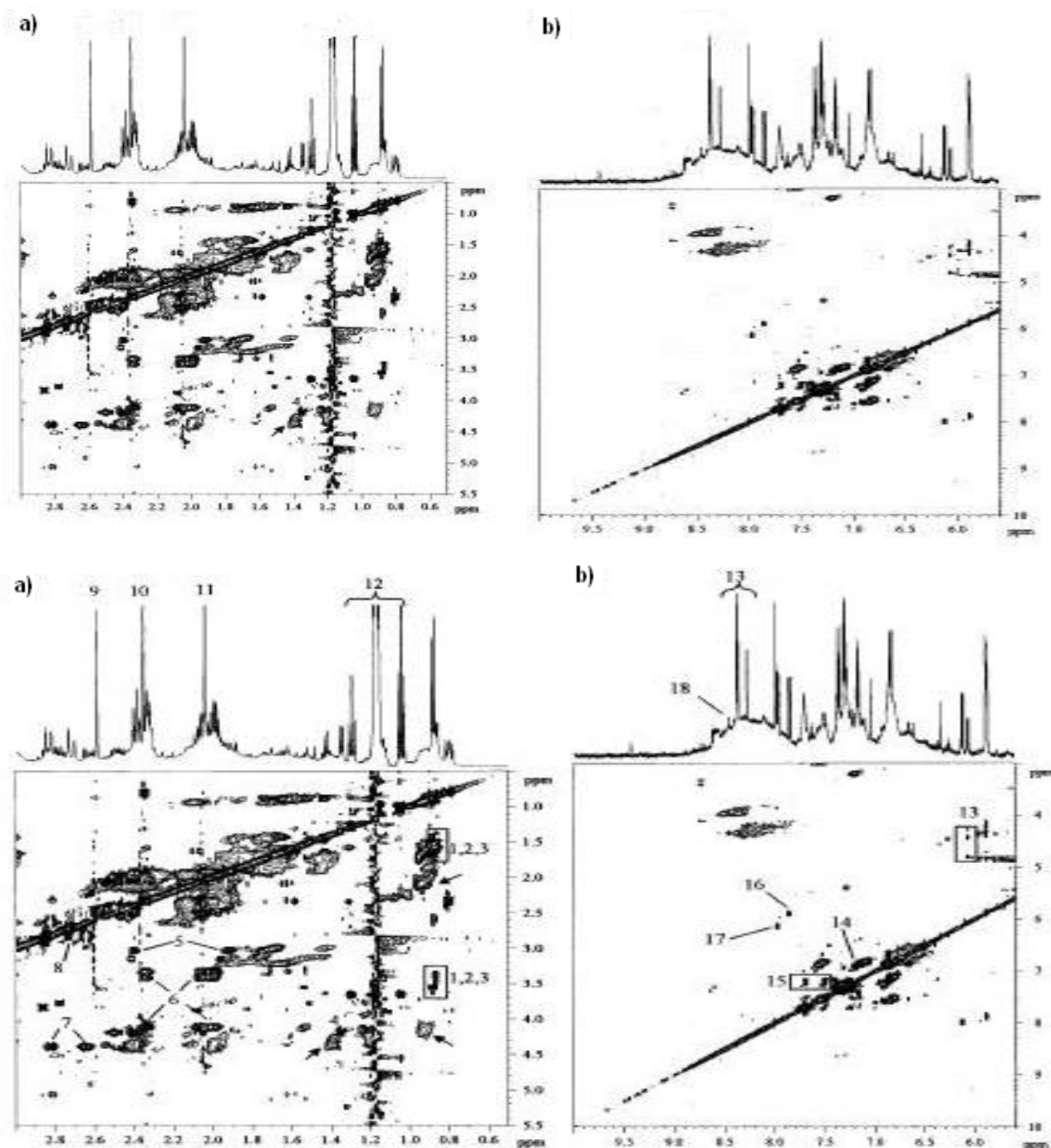


Figura 22: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  2D (TOCSY) da cerveja do tipo Ale, apresentada na Figura 21<sup>49</sup>.

As atuais regulamentações que protegem os produtos agrícolas, através da determinação de origem geográfica (certificação de origem geográfica) têm despertado um grande interesse, especialmente na Europa. Entre os alimentos líquidos, o vinho é um produto extremamente regulamentado pelo fato de que sua qualidade e tipicidade estão diretamente ligadas à qualidade do fruto, ao local e condições de plantio, e aos procedimentos de elaboração da bebida.

A composição de aminoácidos pode ser usada para diferenciar vinhos elaborados através de diferentes variedades de uva, origem geográfica e ano de produção. Por esse fato, as análises de vinhos por RMN de alta resolução foram direcionadas para a determinação da composição total de aminoácidos.

Kosir & Kidric<sup>10-14</sup> realizaram grande parte das pesquisas publicadas sobre a determinação da composição de aminoácidos, em vinhos, usando a técnica de RMN de alta resolução. Esses autores publicaram trabalhos associando técnicas de RMN com a análise de componentes principais (método quimiométrico), em que estabeleceram a origem geográfica de vinhos elaborados na região italiana de Apulia e na Eslovênia<sup>12,14</sup>. As Figuras 23, 24 e 25 mostram espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos vinhos estudados por Kosir e Kidric.

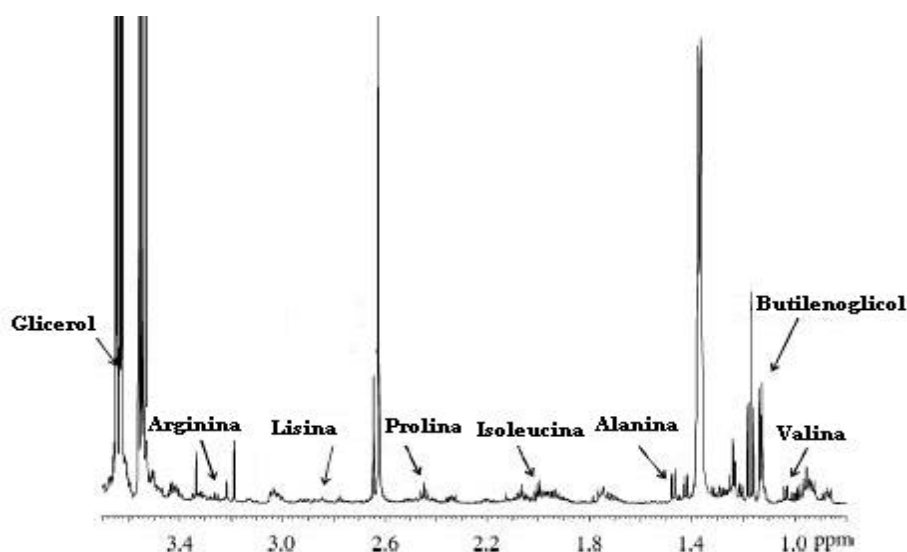


Figura 23: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de vinho tinto obtido em espectrômetro de 600 MHz (0,4 – 3,6 ppm)<sup>13</sup>.

Na Figura 24 é mostrado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do vinho tinto concentrado por liofilização, em que foi aplicada a técnica de supressão dos sinais mais intensos, os quais interferiam nas análises de componentes em menor quantidade<sup>10</sup>.

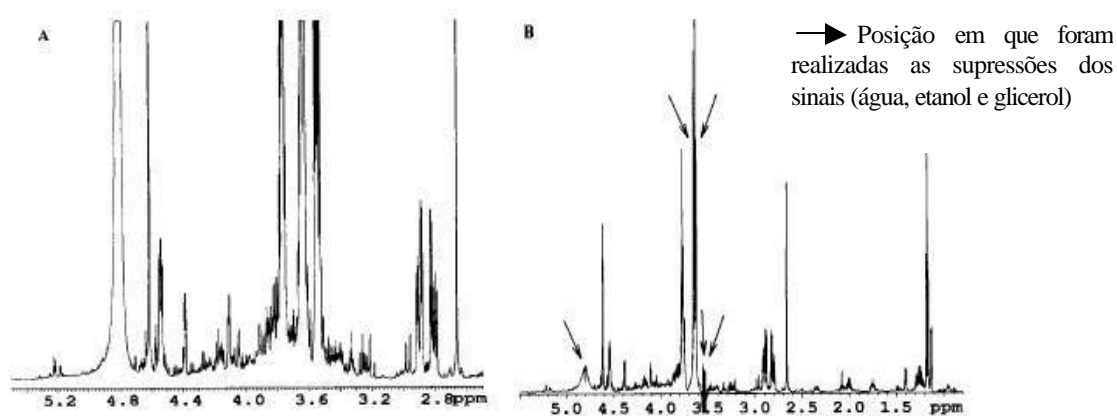


Figura 24: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de vinho tinto liofilizado: sem a utilização da supressão dos sinais mais intensos(a) e com a supressão dos sinais mais intensos (b)<sup>10</sup>.

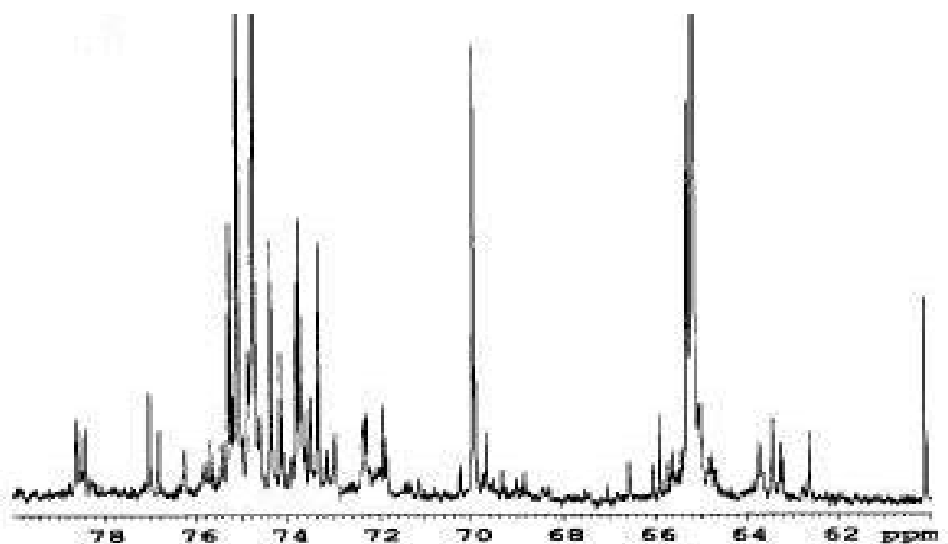


Figura 25: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de vinho tinto liofilizado utilizado para identificação de aminoácidos<sup>10</sup>.



## 2.2 UVAS E VINHOS

O vinho sempre exerceu enorme fascínio sobre o homem e o tem acompanhado em sua trajetória pelo mundo desde os primeiros passos das antigas civilizações. Porém, nunca se viu tamanho interesse pelo vinho – e também pela gastronomia – como nos nossos dias.

Podemos creditar isso à abertura de nosso mercado às importações. Tivemos nossas prateleiras inundadas por vinhos das mais variadas procedências, inclusive de regiões produtoras desconhecidas do consumidor comum como, por exemplo, Austrália e África do Sul.

No entanto as primeiras videiras trazidas para o Brasil vieram da Ilha de Madeira, em 1532 por Martin Afonso de Souza, donatário da capitania de São Vicente. Entre os membros dessa expedição estava Brás Cubas, provavelmente, o primeiro viticultor lusitano a cultivar a vinha no Brasil.

Mas a história da viticultura brasileira teve seu início entre 1732 e 1773, quando povos açorianos instalaram-se na região sul do país, hoje Porto Alegre, plantando em seus vinhedos uvas de castas portuguesas. No século XVIII o açoriano Manoel de Macedo Brum da Silveira foi reconhecido oficialmente por Dom Joao VI como o primeiro produtor de vinho do Rio Grande do Sul<sup>52</sup>.

Entre os anos de 1839 e 1842, o rio-grandense Marques Lisboa, diplomata brasileiro em Washington nos EUA, remeteu castas americanas para o comerciante alemão Thomas Messiter e estas foram plantadas na Ilha dos Marinheiros, atual cidade do Rio Grande. Rapidamente, uvas rústicas como a Izabel, se difundiram pelo sul do Brasil juntamente com a Filoxera (doença que ataca as raízes das uvas *Vitis viníferas*)<sup>53</sup>.

Em 1870, italianos, na sua grande maioria vindos da região do Vêneto, imigraram para o Sul do país e plantaram variedades de uvas típicas de sua península: Trebbiano, Barbera, Malvásia, as quais foram rapidamente substituídas por variedades Americanas (não recomendáveis para a elaboração de vinho), devido à difícil adaptação de castas européias ao solo e clima da região, e pelo fato de terem sofrido o ataque da Filoxera<sup>54</sup>.

Rapidamente os imigrantes italianos transformaram a elaboração de vinho em uma atividade econômica. Durante vários anos a qualidade dos vinhos não sofreu modificações consideráveis. Em 1965, surgiu novamente a preocupação com a melhoria da qualidade e a melhoria das técnicas agrícolas. Nesse sentido a Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul desenvolveu o programa “Plante Viníferas”, o qual incentivava os agricultores a replantarem seus vinhedos com variedades de uvas européias (*Vitis viníferas*), as mais indicadas para a elaboração de vinhos de qualidade.

Em 1970 houve uma grande abertura do mercado nacional para investimentos externos. Com isso, multinacionais se instalaram na região do Rio Grande do Sul e começaram a investir em tecnologia e no incentivo aos agricultores para a colheita de uvas com um ótimo estado sanitário<sup>55</sup>.

Na metade dos anos 80, pequenas vinícolas de origem italiana instaladas na região, começaram a aperfeiçoar o plantio e a tecnologia de elaboração de vinho. Os viticultores rurais também implementaram um programa de estímulo à modificação do sistema de plantio, passando da “latada” à “espaldeira”.

Grandes esforços estão atualmente concentrados na melhoria da qualidade dos vinhos elaborados no território nacional como o estudo de regiões com micro climas ideais para o plantio de variedades viníferas, a diminuição do rendimento por hectare, a implantação de sistemas de cultivo mais modernos, a aplicação de novas técnicas enológicas e o acompanhamento periódico através de análises químicas do vinho elaborado.

A vitivinicultura brasileira evoluiu de maneira extraordinária nas duas últimas décadas, e o Brasil produz hoje vinhos de boa qualidade. O atual panorama vinícola brasileiro é animador. Em setembro de 1995, o Brasil passou a ser membro da OIV (Office International de la Vigne e du Vin ou, simplesmente, Organização Internacional do Vinho), organismo que regulamenta as normas internacionais de produção do vinho, cujo cumprimento resulta obrigatoriamente, na elevação do padrão de qualidade de nossos vinhos<sup>54</sup>.

Porém a vitivinicultura brasileira ainda é dificultada por alguns fatores como: o pequeno consumo (cerca de apenas 2,75 l/ ano), resultante da falta de tradição vinícola e do baixo poder aquisitivo do brasileiro. Desconsiderando as dificuldades de solo e

clima, os vinhos brasileiros ostentam padrão internacional de qualidade, e lutam pela implementação de um sistema de Denominação de Origem Controlada (D. O. C.), que certamente contribuirá para garantir a melhoria da qualidade dos vinhos, através da incorporação de regras mais rígidas de controle de qualidade<sup>56</sup>.

### 2.2.1 Cultivo de uvas *Vitis viníferas*

O vinho pode ser feito de uvas de diferentes tipos. A vinha, pertence a família das *Vitaceae*. Essa família compreende quatorze gêneros, mas, apenas o *Vitis* produz vinho de qualidade.

O *Vitis* compreende dois subgêneros: Muscadínea e Euvitis. Dentro do subgênero Euvitis, encontra-se a espécie vinífera que é responsável pela produção dos melhores vinhos do mundo<sup>57</sup>.

Todas as uvas pertencentes à espécie vinífera podem originar grandes vinhos, desde que se disponha de boas condições de solo, clima e vinificação. Em geral, só atingem extrema qualidade em seus locais de origem na Europa, mas algumas como a tinta Cabernet Sauvignon e a branca Chardonnay adaptaram-se bem em diversas regiões do mundo. No Brasil, em 2004, somente 15% dos vinhos foram elaborados a partir de uvas, *Vitis viníferas*<sup>58</sup>.

As vinhas denominadas de comuns (americanas e asiáticas) originam vinhos de qualidade inferior e são usadas preferencialmente, para a produção de sucos ou uvas de mesa. Estas representaram, em 2004, cerca de 85% da produção brasileira de vinhos<sup>58</sup>.

A qualidade da uva a ser usada na vinificação pode ser influenciada por uma série de fatores como solo, relevo, orientação, clima; escolha do porta enxerto, sistema de conduta, uso de aditivos agrícolas, rendimento por hectare e escolha da data de colheita<sup>59</sup>.

## A influência do solo sobre a qualidade da uva

O solo é considerado um elemento determinante, tanto sobre o plano qualitativo quanto quantitativo. Em geral, a vinha prefere solos formados de cascalho que favorecem uma boa drenagem, acumulam o calor do dia e proporcionam uma maior incidência de luminosidade sobre a uva. Normalmente, os melhores resultados são obtidos em solos pobres cujo rendimento é limitado, com pH variando de 5,0 a 6,0.

Solos muito ricos em matéria orgânica geram um grande vigor na vinha, podendo ocasionar falta de maturação da uva, e como consequência, poderá originar vinhos de constituição “desequilibrada”.

Entre os elementos de grande importância na composição do solo, destacam-se a sílica que contribui na formação do bouquet conferindo delicadeza ao vinho; o calcário que influencia no “equilíbrio”, na “estrutura” e no grau alcoólico; a argila que proporciona “dureza” (acidez) e taninos; o xisto e ferro que dão a cor e a durabilidade ao vinho.

Os solos ideais contêm esses elementos, no entanto algumas uvas têm seus melhores resultados em solos específicos como, por exemplo, a uva Gamay necessita de solos graníticos e a uva Chardonnay prefere os solos calcários<sup>60</sup>.

Nos países tradicionalmente conhecidos pela elaboração de vinhos de qualidade como Itália e França, as características naturais do solo proporcionam a obtenção de vinhos “estruturados” e com as características próprias de cada terreno e clima (terroir).

No Brasil, pelo fato da cultura da uva ser relativamente recente, pouco se conhece sobre os solos próprios para o cultivo de uvas *Vitis viníferas*. Outro fato marcante é que práticas habituais utilizadas nas lavouras (como uso de fertilizantes, corretores de pH e a adição de outros nutrientes) são usadas também no cultivo de uvas viníferas o que pode influenciar diretamente na qualidade do vinho elaborado.

## Fatores relacionados ao clima

O Clima é outro fator de grande importância e está diretamente ligado à luminosidade, quantidade de chuva, temperatura, vento que são os fatores responsáveis pela qualidade da safra.

As videiras dão seus melhores resultados em climas temperados localizados na escala cartográfica entre as latitudes de 30° e 50° tanto ao norte quanto ao sul como pode ser visto no mapa mundial do vinho (Figura 26)<sup>61</sup>.

A latitude implica na temperatura do ar, a qual diminui a partir do Equador à medida que aumenta a latitude em direção aos Pólos. A latitude é também determinante na radiação solar total recebida nas diferentes estações do ano.

No Brasil, a viticultura destinada à agroindústria, é encontrada desde os 8° (Vale do Submédio São Francisco) até os 32° de latitude Sul (Serra do Sudeste no Estado do Rio Grande do Sul), localizada em latitudes baixas a médias. Situação bastante diferenciada da viticultura desenvolvida em latitudes mais elevadas como nas regiões setentrionais da Europa e da América do Norte, onde a viticultura chega até os 52° de latitude Norte.

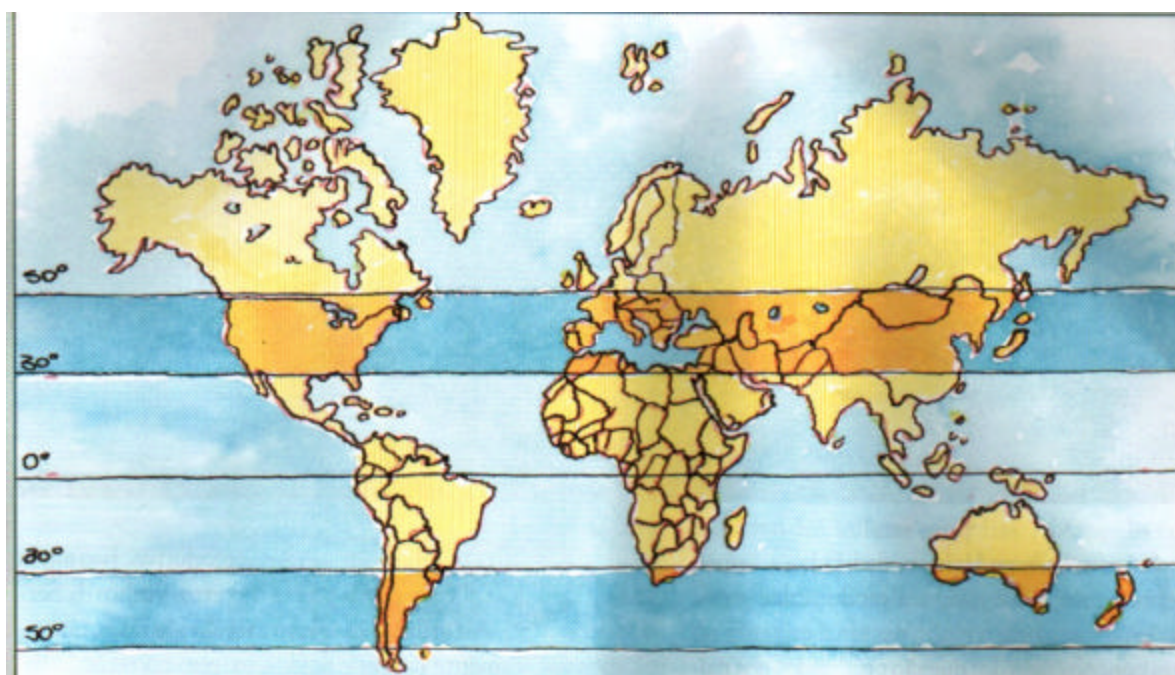


Figura 26: Mapa do mundo com a demarcação das latitudes. Em amarelo escuro estão apresentadas as principais regiões produtoras de vinhos.

Durante o ciclo vegetativo das videiras as variações de temperatura nas diferentes épocas do ano têm forte influência sobre a qualidade da uva. A videira é bastante resistente às baixas temperaturas na estação do inverno, quando se encontra em período de repouso vegetativo. O frio invernal é importante para a “quebra de dormência das gemas”, no sentido de assegurar uma brotação adequada para a videira.

Em condições de pouco frio invernal, que podem ocorrer nos climas subtropicais, torna-se necessário a adoção de tratamentos e práticas culturais visando garantir uma porcentagem satisfatória de brotação das videiras.

De forma genérica considera-se a temperatura de 10°C como mínima para que possa haver desenvolvimento vegetativo; do final do inverno ao início da primavera, quando ocorre a brotação das videiras, temperaturas baixas podem ocasionar geadas tardias que causam a destruição dos órgãos herbáceos da planta. Assim, regiões com elevado risco de geadas durante o período vegetativo da videira devem ser evitadas. O plantio de cultivares de brotação tardia em locais com riscos baixos a moderados de geadas é prática corrente na viticultura<sup>62,63</sup>.

No período de floração da videira, temperaturas iguais ou superiores a 18°C são favoráveis, sobretudo se associadas a dias com bastante insolação e pouca umidade.

A maior atividade fotossintética é obtida na faixa de temperaturas que vai de 20°C a 25°C, sendo que temperaturas a partir de 35 °C são excessivas. Na estação de verão, temperaturas diurnas amenas possibilitando um período de maturação mais lento são favoráveis à qualidade. Igualmente a ocorrência de noites relativamente frias favorece o acúmulo de polifenóis, especialmente as antocianinas nas cultivares tintas e um aumento na intensidade dos aromas nas cultivares brancas. Condições térmicas muito quentes podem resultar na obtenção de uvas com maiores teores de açúcares, porém com baixa acidez. A ocorrência de geadas outonais (precoces) acelera a queda das folhas e o fim do ciclo vegetativo da planta.

Além do fator temperatura, a incidência de radiação solar também é controlada pela latitude. Durante o período vegetativo a vinha requer elevada insolação para os processos de fotossíntese, implicando na definição da composição química da uva. Para a viticultura sul-brasileira, a fim de se obter uma maior insolação é preferencial a

exposição dos vinhedos em encostas com exposição Norte<sup>62</sup>. Normalmente, as encostas são menos férteis que as condições de vales, além de proporcionarem maior insolação sobre as videiras e maior drenagem do terreno, possibilitando colheitas menos abundantes com maior qualidade.

Pra driblar as dificuldades climáticas brasileiras, uma alternativa vem sendo a implantação de vinhedos em regiões de altitudes, pois o efeito mais importante da altitude para a viticultura é sobre a temperatura, já que 100 metros de elevação do nível do mar representam diminuição ao redor de 0,6°C na temperatura média do ar.

A precipitação pluviométrica é um dos elementos mais importantes do clima em viticultura. A demanda hídrica da videira varia em função das diferentes fases do ciclo vegetativo. Sendo que, na fase que se estende da brotação ao término da maturação, as precipitações pluviométricas devem ser as mais escassas do ciclo, variando de 250 mm a 350 mm<sup>64</sup>.

### **A importância do uso de porta enxertos**

O cultivo de uvas européias (*Vitis vinífera*) pressupõe o uso da enxertia, tendo em vista que a espécie é sensível a filoxera, praga amplamente difundida no mundo, que ataca o sistema radicular da videira.

Os porta-enxertos também são usados em viticultura com diversos outros objetivos como adaptação a determinadas condições climáticas (regiões temperadas ou tropicais), adaptação a diferentes tipos de solo (calcários, ácidos, salinos), controle de pragas e doenças de solo (nematóides, fusariose)<sup>57</sup>.

Normalmente, os porta-enxertos induzem maior vigor, precocidade de produção e maior produtividade das copas em relação ao pé-franco, no entanto, para o cultivo de uvas destinadas à elaboração de vinhos de qualidade deveriam ser preferidos os porta-enxertos de menor vigor, para privilegiar a qualidade da matéria-prima. Para as uvas Cabernet sauvignon não é aconselhável rendimentos superiores a 5000kg/hectare.

Entre os principais porta-enxertos utilizados na viticultura do sul do Brasil podemos destacar; Paulsen 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) e VR043-43 (*V. rotundifolia* x *V. vinífera*)<sup>65</sup>.

## **Os diferentes tipos de sistemas de condução**

Atualmente, são utilizados na viticultura brasileira três tipos principais de sistemas de condução das videiras: latada, espaldeira e manjedora.

O sistema de condução latada é o mais utilizado na cultura de uva no Brasil, apresenta a desvantagem, de que massa folhar pode encobrir os cachos diminuindo a luminosidade e aumentando a umidade, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças.

O sistema de espaldeira é o mais utilizado mundialmente no cultivo de uvas viníferas e foi recentemente implantado no Brasil. Este tipo de sistema permite uma maior insolação dos cachos e facilidade de manuseio para a colheita.

O sistema de manjedora, também denominado de sistema V, é pouco difundido no território nacional, pois sua implantação é relativamente cara. A vantagem desse sistema, quando comparado à espaldeira, é a ampliação da área folhar com alta incidência de sol aumentando desta forma a produtividade do vinhedo<sup>57,66,67</sup>.

## **Maduração e colheita**

A maduração da uva é o período que se estende desde a mudança de cor da uva (período chamado de veração) até a colheita. Dura de 35 a 65 dias, dependendo da cultivar e da região de cultivo. Durante esse período, a uva amolece cada vez mais, devido à perda de rigidez da parede das células da película e da polpa; ocorre um aumento no teor dos dois principais açúcares (glicose e frutose)<sup>68</sup>.

Algumas características importantes de um vinho começam a serem definidas no momento em que se colhe a uva. Por isso, torna-se muito importante determinar com a maior exatidão, a data da colheita.

O critério de controle mais utilizado é o grau glucométrico (teor de açúcar), medido em escala de graus Babo, que representa a percentagem de açúcar existente em uma amostra de mosto (suco da uva), ou em escala de graus Brix, que representa o teor de sólidos solúveis totais na amostra, 90% dos quais são açúcares.



A medida da acidez realizada através de ensaios de titulação ou pela medida do pH do suco da uva é outro fator de controle para a determinação da data de colheita. Valores típicos de acidez titulável podem variar de 0,4 a 1,0 gramas de ácido tartárico por 100ml do mosto. O balanço entre teor de açúcar e acidez confere ao vinho um equilíbrio gustativo determinante para sua qualidade geral. Cada uva tem o seu ponto de equilíbrio e cada produtor pode determinar qual a relação que mais lhe interessa<sup>69</sup>.

Normalmente as uvas cultivadas em regiões de clima quente como na Califórnia – USA, apresentam na época de maturação altas concentrações de açúcares e baixa acidez do mosto (pH na faixa de 3,4), enquanto que vinhos elaborados em regiões de climas mais amenos geram uvas com valores mais elevados de acidez (pH na faixa de 2,91).

### Composição e estrutura da uva

O cacho de uva é composto de duas partes: o engaço que constitui a estrutura do cacho e as bagas as quais são compostas de pele, polpa e semente (Figura 27).

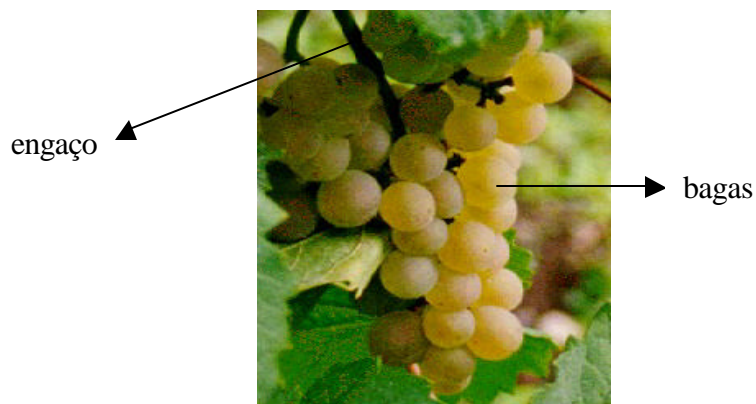


Figura 27: Ilustração das partes de um cacho de uva

O engaço representa de 3 a 7% do peso da colheita, liga as bagas e as folhas e é responsável pela translocação dos açúcares, produzidos durante o processo de fotossíntese, das folhas para as bagas. Quando mastigamos um pedaço do engaço várias sensações são sentidas<sup>59</sup>, como descrito na Tabela 1.

Tabela 01: Aspectos sensoriais e composição do engaço

SABOR	CONSTITUINTE	PAPEL NA VINIFICAÇÃO
Áspero	Taninos	Presença necessária para a conservação dos grandes vinhos
Ácido	Substâncias colorantes	Proporcionam frescor ao vinho
Matéria fibrosa	Celulose	Fornece leveza ao vinho
	Substâncias minerais	Servem de nutrientes para as leveduras
	Água	Desvantajosa em certas condições, diminui a graduação alcoólica

A constituição de um vinho será diferente se o engaço for ou não utilizado na sua elaboração.

A baga de uva é composta de 3 partes (Figura 28): película, polpa e as sementes. A película constitui 10% do peso da baga, é recoberta por uma fina camada cerosa e esbranquiçada que recebe o nome de pruína. A película das uvas é rica em taninos e substâncias colorantes, como as antocianinas para as uvas tintas e as flavonas para as uvas brancas. Estas substâncias são responsáveis pelas cores dos vinhos. Substâncias específicas de cada casta encontram-se na película sob a forma de precursores de aromas.

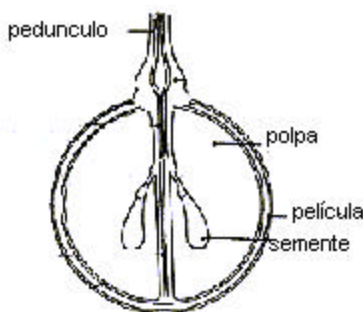


Figura 28: Composição da baga da uva.

A polpa representa cerca de 80% do peso do bago, constituindo uma das partes mais importantes da uva. A polpa é incolor e formada essencialmente de água, açúcares (glicose e frutose), ácidos orgânicos (tartárico, málico e cítrico), sais minerais, substâncias nitrogenadas (principal alimento das leveduras), pectina, vitaminas e enzimas.

A baga da uva pode conter 2,3 ou 4 sementes que constituem 4 a 5 % do peso da baga. As sementes são indesejáveis na fermentação devido à alta concentração de taninos e substâncias oleosas<sup>70</sup>.

### 2.2.2 Elaboração de vinhos finos

Após serem colhidas as uvas são transportadas para as vinícolas onde devem ser rapidamente processadas. Uma vez que as uvas estejam prontas para a vinificação e tenham sido espremidas, acrescenta-se uma pequena dose de dióxido de enxofre. Isto é um método utilizado há muitos anos para prevenir a fermentação prematura e a oxidação do mosto ou do vinho. Alguns produtores tratam de utilizá-lo em mínimas quantidades e pretendem eliminá-lo por completo, utilizando barreiras físicas como gases inertes entre o mosto ou vinho e o oxigênio na atmosfera<sup>71</sup>.

A elaboração de vinhos brancos é diferenciada da elaboração de vinhos tintos em vários aspectos. Sucintamente, na elaboração de vinhos tintos as uvas após chegarem às vinícolas, são desengaçadas e esmagadas ou esmagadas mantendo-se os talos intactos. O mosto (suco da uva ou suco mais casca) obtido deste processo é transferido para os tonéis de madeira, aço inoxidável, cimento, resina com fibra de vidro ou ainda, para tonéis de carvalho<sup>72</sup>.

Após esta etapa, o mosto inicia o primeiro processo de fermentação, chamada de fermentação alcoólica, que tem como objetivo principal a transformação dos açúcares em álcool pela ação de leveduras, as quais podem ser selecionadas, dependendo do vinho que se deseja elaborar. Na fermentação dos vinhos tintos podem ser utilizadas três técnicas diferentes de fermentação alcoólica.

As uvas podem passar um período curto (2 ou 3 dias) em contato com a casca e depois a fermentação continua sem a casca, esse método é utilizado para a obtenção

de vinhos tintos leves. Na elaboração de vinhos mais encorpados e com maior quantidade de taninos, a fermentação ocorre com a presença da casca, a uma temperatura de 24° a 26°C de uma a três semanas. Se os talos forem mantidos no mosto, este permanecerá juntamente com a casca até o final do processo de fermentação.

A maceração carbônica é o método menos utilizado, neste caso as uvas são colocadas intactas dentro dos barris de madeira ou de aço inoxidável. As uvas que ficam no fundo se partem e começam a fermentar de forma natural. O tonel é selado e nele é injetado óxido de enxofre, o que provoca o processo de fermentação dentro das uvas inteiras; a cor da casca cora o mosto, mas a quantidade de tanino extraída da casca é relativamente pequena. Ao término do processo de fermentação as uvas se partem deixando sair o suco. Esse método é usado para a elaboração de vinhos tintos, leves e frutados<sup>70</sup>.

Após a fermentação alcoólica, os vinhos passam por um segundo processo fermentativo, chamado de fermentação malolática, realizado por bactérias lácticas, e que tem por principal objetivo a diminuição da acidez do mosto, através da conversão do ácido málico em ácido láctico.

Durante os processos fermentativos uma série de reações bioquímicas ocorrem paralelamente, gerando uma série de compostos (álcoois de cadeia longa, ésteres, açúcares conjugados, entre outros) que determina grande parte das características organolépticas da bebida.

O vinho, após completar os processos fermentativos ainda não está pronto, deve “amadurecer” a fim de desenvolver seu estilo e características particulares. Muitos dos vinhos tintos modernos “amadurecem” por um curto período de tempo, já que são elaborados para seu consumo imediato, mas a maioria dos vinhos necessita um período mais longo de maturação antes de ser engarrafado, para estabilizar seus taninos e ressaltar seus sabores.

Dessa forma, os vinhos podem ser filtrados, centrifugados e engarrafados logo após o término da fermentação malolática, ou podem “maturar” por meses ou por anos em tonéis de aço inoxidável ou concreto, o que não alterará seu sabor. O vinho pode também maturar em grande barris de madeira com uma capacidade de milhares de

litros. Esse procedimento reduz os aromas frutados do vinho. A “maturação” em tonéis de madeira (na maioria dos casos, carvalho) de 225 litros de capacidade, é o método mais usado para a maturação de vinhos “estruturados” com alta longevidade<sup>60</sup>.

Na elaboração de vinhos brancos normalmente as uvas são prensadas e imediatamente separadas de suas cascas, mas em certos casos o mosto pode permanecer em contato com as cascas por até doze horas, a baixas temperaturas a fim de extrair os aromas de fruta e conferir uma maior “estrutura” ao vinho.

O processo de fermentação alcoólica nos vinhos brancos deve realizar-se a temperaturas entre 15°C e 20°C e por um período de pelo menos, um mês. Da mesma maneira que os vinhos tintos, a fermentação pode ser realizada em grandes tonéis de aço inoxidável, concreto ou resina com fibra de vidro, só que neste caso devem ser mantidos frios.

Ao contrário dos vinhos tintos, que via de regra, passam pela fermentação malolática, nos vinhos brancos, nem sempre é realizado este tipo de fermentação. Em regiões de climas quentes, onde se obtém uvas com baixa acidez, a fermentação malolática pode não ser desejável, pois os vinhos brancos necessitam de uma certa acidez para serem considerados “equilibrados”, ou ao contrário, são denominados de vinhos “planos”, sem “estrutura” e “corpo”<sup>73</sup>.

A maioria dos vinhos brancos são feitos para serem tomados frescos e novos, porém existem diversos métodos de maturação. Os vinhos brancos mais frescos e leves, são armazenados em tonéis estéreis evitando o contato com o ar. Na Alemanha, os melhores Rieslings são “maturados” por um ano ou mais, em grandes tonéis de madeira. Os Borgonha de qualidade e outros Chardonnay, os bons Graves (Bordeaux) e alguns Sémillon e Sauvignon, são “maturados” em pequenos tonéis de carvalho por um ano ou menos, o que lhes dá “densidade”, “corpo”, aromas e sabores característicos<sup>74</sup>.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes utilizados

Os padrões de substâncias utilizados no trabalho foram: L-alanina, L-prolina, D,L-frutose e D,L-glicose da marca VETEC com grau de pureza de 99,7%. O ácido málico,  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose de procedência SIGMA-ALDRICH (Fluka) com grau de pureza >98%. Como padrão interno foi utilizado trimetil-silil-propionato de sódio (TMSP) marca Cambrige Isotope Laboratories Inc. (CIL) 98% D.

Para o aprisionamento do campo magnético todas as amostras foram diluídas com 20% de água deuterada de procedência Cambrige Isotope Laboratories Inc. (CIL) 99,9% D. Os tubos de RMN foram lavados com água destilada e acetona PA marca F. MAIA Ind e Com. Ltda. (99,5%).

#### 3.2 Limite de detecção e Curva de calibração

Os estudos de limite de detecção e a correlação entre a concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) e a área do sinal foram determinados em dois espectrômetros de ressonância magnética. O primeiro estudo a ser apresentado foi desenvolvido em um espectrômetro de RMN de 4,7 Tesla da marca Bruker (AC 200 F), os demais experimentos foram realizados em um espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla da marca Varian (MERCURY PLUS).

##### 3.2.1 Instrumentação para obtenção de espectros de RMN de $^1\text{H}$ (4,7Tesla)

Os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados em um espectrômetro BRUKER AC 200 F operando na frequência de 200 MHz para o núcleo de hidrogênio, utilizando um probe de 5 mm. Os dados foram processados utilizando software fornecido pelo equipamento BRUKER AC 200 F. Todos os experimentos foram realizados a temperatura de 25°C utilizando 400  $\mu\text{L}$  de amostra. A água deuterada foi

utilizada como solvente, os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados de acordo com o padrão de referência utilizado: trimetil-silil-propionato de sódio (TMSP), 0ppm. Os parâmetros utilizados para a aquisição dos espectros foram os seguintes: janela espectral de 5000,00 Hz, número de pontos 16k, tempo de espera entre pulsos (delay time) de 3 segundos, número de transientes (scans) variável para cada experimento, pulso de  $10^\circ$  (0,8 micro segundos), tempo de aquisição de 1,63 segundos.

Após a realização de transformadas de Fourier dos decaimentos livres de indução, os espectros foram manualmente colocados em fase e tiveram sua linha base corrigida. As regiões de interesse foram integradas manualmente.

### 3.2.2 Instrumentação para obtenção de espectros de $^1\text{H}$ RMN (9,4Tesla)

Os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados em um espectrômetro VARIAN MERCURY PLUS operando na frequência de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio (magneto marca OXFORD), utilizando um probe inverso multinuclear de 5 mm. Os dados foram processados utilizando o software fornecido pelo equipamento VARIAN MERCURY PLUS. Todos os experimentos foram realizados a temperatura de  $25^\circ\text{C}$  utilizando 0,4 ml de amostra; 0,1 ml de água deuterada foi utilizada como solvente e todos os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados de acordo com o padrão de referência utilizado: trimetil-silil-propionato de sódio (TMSP).

Com objetivo de determinar o tempo de espera entre cada pulso (delay time), foram realizadas medidas de tempo de relaxação longitudinal, também chamado de tempo de relaxação spin-rede ( $T_1$ ), para cada hidrogênio específico de cada substância a ser quantificada, através da seqüência de pulso denominada de inversion recovery ( $180^\circ$  - relaxação delay(d1) -  $90^\circ$  - aquisição). O tempo de relaxação (delay) (d1) variou de 0,01 a 10 segundos, os valores de tempo de relaxação foram fornecido pelo software do equipamento, obteve-se os valores de  $T_1$  de cada hidrogênio de interesse. Utilizou-se, para fins quantitativos, um pulso de  $45^\circ$  (6,4 micro segundos) e um intervalo

de tempo de espera entre pulso de 3 vezes o valor do maior tempo de relaxação obtido nas medidas<sup>21</sup>.

Os demais parâmetros utilizados para a aquisição foram os seguintes: janela espectral de 6398,00 Hz, número de pontos 16k, número de transientes (scans) de 256 e tempo de aquisição de 2,730 segundos. Nessas condições obteve-se um tempo total do experimento de 1 hora e 3 minutos.

Após a realização de transformada de Fourier dos decaimentos livres de indução, os espectros foram manualmente colocados em fase e tiveram sua linha base corrigida. As regiões de interesse foram integradas manualmente.

### 3.2.3 Limite de detecção e curva de calibração para espectrômetro de RMN de 4,7Tesla.

A fim de estudar a relação entre a concentração de um analito ( $\text{gL}^{-1}$ ) e a área do sinal normalizada pelo padrão interno TMSP no espectrômetro BRUCKER AC 200 F foram analisadas soluções de ácido succínico de diferentes concentrações (16 – 0,16 $\text{gL}^{-1}$ ). Os espectros foram obtidos nas condições descritas no sub item 3.2.1 com acúmulo de 64 scans.

Utilizou-se, como parâmetro para a identificação do limite mínimo de detecção, a resolução 475 de 19 de março de 2002, da ANVISA que estipula que o limite mínimo de detecção deve ser o sinal superior a três vezes o ruído da linha de base<sup>75</sup>.

Uma vez delineados os valores de concentrações limites para a substância em estudo, foram realizados experimentos para investigar a influência do número de transientes (scans) sobre a medida da área do sinal para a solução de ácido succínico. Nesse estudo foram determinados o desvio padrão e o erro nas medidas (3 medidas), em função de diferentes números de scans (64, 128, 256 e 512 scans).

A partir desses valores foi realizada uma curva de calibração do ácido succínico normalizada em função do sinal do TMSP, cuja concentração (3 $\text{gL}^{-1}$ ) foi mantida constante para determinar a linearidade das medidas, método do padrão interno.



### 3.2.4 Limite de detecção, limite de quantificação e curva de calibração, para o espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla

Para o estudo da relação entre a concentração do analito ( $\text{g L}^{-1}$ ) e a área do sinal normalizada pela área do sinal TMSP (0 ppm), foram realizadas soluções aquosas de diferentes concentrações de DL-prolina ( $16,00 - 0,0016 \text{ g L}^{-1}$ ), DL-alanina ( $16,00 - 0,0016 \text{ g L}^{-1}$ ), ácido málico ( $40,00 - 0,20 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\alpha$ -glicose ( $78,00 - 0,078 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\beta$ -glicose ( $42,00 - 0,042 \text{ g L}^{-1}$ ) e frutose ( $120 - 0,15 \text{ g L}^{-1}$ ). Todas as soluções apresentavam 20% de  $\text{D}_2\text{O}$  e TMSP na concentração de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  como padrão interno e sinal de referência  $\delta = 0$  ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos nas condições descritas no subitem 3.2.2. Os sinais em 5,23 (dublete) para a  $\beta$ -glicose, 4,11 ppm (dublete) para a frutose, 3,24 ppm (duplo dublete) para a  $\alpha$ -glicose, 2,83 e 2,64 ppm (duplo dublete) para o ácido málico, 2,34 ppm (multiplete) para a DL-prolina, 1,49 ppm (dublete) para a DL-alanina, e o sinal em 0 ppm (singleto) referente ao padrão interno de TMSP foram integrados e analisados. Utilizou-se, como parâmetro para a identificação do limite mínimo de detecção, a resolução 475 de 19 de março de 2002, da ANVISA que estipula que o limite mínimo de detecção deve ser o sinal superior a 3 vezes o ruído da linha de base<sup>75</sup>. O limite de quantificação foi determinado através da concentração mínima quantificada da substância com precisão a 5% e exatidão obtidos a partir de ensaios de recuperação<sup>76</sup>.

A precisão das medidas foi calculada através da medida sucessiva de 5 amostras com a mesma concentração de analito ( $n=5$ ) e admitido desvio padrão relativo menor ou igual a 5%.

O teste de recuperação consiste em adicionar à amostra uma determinada quantidade do analito. A quantidade de analito adicionada deve ser próxima à quantidade previamente medida na amostra, antes da adição do analito. Dessa forma, a concentração final deve ser igual a soma das duas concentrações (da concentração medida na amostra mais a concentração adicionada). Pela diferença entre as duas concentrações obtém-se o valor recuperado do analito adicionado, que é representado na forma percentual do valor adicionado (R%)<sup>77</sup>.

### 3.3 Análise de vinhos Chardonnay brasileiros por RMN de $^1\text{H}$ (4,7 Tesla)

Nessa etapa do trabalho será apresentada a metodologia usada na preparação das amostras de vinhos brancos brasileiros para a caracterização de sua composição química por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ .

#### 3.3.1 Amostras de vinhos brasileiros

As amostras de vinhos analisadas foram cedidas pela vinícola Marson localizada no Rio Grande do Sul e adquiridas em lojas especializadas em vinhos, em Florianópolis.

#### 3.3.2 Técnicas de pré-preparo das amostras

As amostras de vinho foram analisadas diretamente e concentradas por diferentes métodos, com objetivo de melhorar a resolução dos sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de identificar os sinais das substâncias presentes em menor concentração.

##### i) Amostragem sem pré-tratamento.

Para a análise direta do vinho, utilizou-se 0,4 ml de vinho os quais foram colocados diretamente em tubo de RMN, a este se adicionou 0,1 ml de água deuterada. Realizou-se análise de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HETCOR, o pH aparente da amostra foi medido através de papel indicador.

##### ii) Concentração por liofilização.

Para posterior análise, 4 ml de vinho Chardonnay (Vinícola Marson) foram colocados em uma balão volumétrico de 25 ml, congelados e liofilizados durante 20 horas, resultando em um resíduo viscoso o qual foi dissolvido com 0,5 ml de água

deuterada e analisado por RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , técnicas de DEPT, COSY e HETECOR. O pH aparente da amostra da solução foi medido através de papel indicador.

iii) Concentração por arraste de nitrogênio.

Foram concentrados 4 mL de vinho (155,4mg) por fluxo de  $\text{N}_2$ , até completa evaporação do líquido (4 horas), resultando em um resíduo viscoso o qual foi dissolvido com 0,5mL de água deuterada e analisado por RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , técnicas de DEPT, COSY e HETCOR. O pH aparente da solução foi medido através de papel indicador.

### 3.3.3 Parâmetros de obtenção dos espectros

Os espectros das amostras de vinhos preparados conforme descrição acima, foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker AC 200, 200MHz equipado com um Magneto OXFORD , operando com uma frequência de 200MHz para  $^1\text{H}$  e de 50,13MHz para  $^{13}\text{C}$  utilizando um probe de 5mm.

Os espectros de 1D RMN foram obtidos com pulso de  $12^\circ$  (1,0 micro segundo) para hidrogênio e  $45^\circ$  (3,0 micro segundos) para os núcleos de carbono com tempo de espera entre pulsos (delay time) de 3 segundo, com sw (janela espectral) de 2100Hz e 15150Hz para os experimento de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente, com 16K de memória “data points” e 256 transientes para hidrogênio e 38000 transientes para carbono. Todas as medidas foram efetuadas a uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e com velocidade de rotação de 20 Hz. O sinal da água no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (4,7ppm) foi pressaturado através da seqüência de pulso PRESAT, fornecida pelo software Bruker (DISNMR).

Para a identificação e confirmação dos sinais nas amostras foram realizados experimentos de DEPT e experimentos de 2D homonuclear  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) e hetronuclear  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HETCOR).

### 3.3.4 Análise qualitativa das amostras de vinhos por RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ (4,7 Tesla)

Para a identificação dos sinais foram usados: ácido succínico de procedência SIGMA-ALDRICH (Fluka), ácido láctico VETEC, os aminoácidos alanina, arginina, lisina, leucina de procedência AGINOMOTO e valina de procedência SIGMA-ALDRICH.

Da mesma forma foram pesados 1,0mg de cada substância e adicionados diretamente ao tubo de NMR contendo as amostras de vinho sem pré-tratamento e concentradas por  $\text{N}_2$ . Seguiu-se o aparecimento dos respectivos sinais de aminoácidos ou aumento da intensidade dos sinais nos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , confirmando a presença ou ausência dos mesmos.

### **3.4 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN durante o desenvolvimento das uvas Cabernet sauvignon e Chardonnay.**

#### **3.4.1 Amostragem e Coleta**

O estudo foi realizado com as uvas Chardonnay e Cabernet Sauvignon enxertadas sobre o porta-enxerto Paulsen 1103, cultivada nos vinhedos da propriedade Quinta da Neve no município de São Joaquim; e uvas Cabernet Sauvignon enxertadas sobre os porta-enxertos Paulsen 1103 e VR-043-43, cultivadas nos vinhedos da Empresa Videcar no município de Videira-SC.

A plantação de Chardonnay do vinhedo Quinta da Neve foi formada em 26 de dezembro de 2000, sendo conduzida em espaldeira com espaçamento entre as plantas de 1,5m e entre as fileiras de 3,00m. A área de cultivo é de 0,4473 hectares, com um número total de 994 pés (Figura 29). Na safra 2004 a floração ocorreu dia 17/11/2003.



Figura 29: Vinhedo Chardonnay da Quinta da Neve na região de São Joaquim-SC.

As amostras de uvas foram coletadas aleatoriamente durante os meses de Novembro/ 2003, Dezembro/2003, Janeiro/2004 e Fevereiro/2004. O acompanhamento do desenvolvimento da uva foi realizado com um total de quatro amostragens, através da coleta de 10 cachos em cada amostragem. O trabalho de coleta teve início em 23 de novembro de 2003, 6 dias após a floração. As datas de coleta correspondem a 6, 35, 65 e 101 dias após a floração.

A plantação de Cabernet sauvignon do vinhedo Quinta da Neve foi formado em 20 de dezembro de 2000, sendo conduzida em espaldeira com espaçamento entre as plantas de 1,5m e entre as fileiras de 3,15m, com uma área de cultivo de 11,099 hectares.

Da mesma forma, dez cachos de Cabernet sauvignon enxertadas sobre porta-enxerto Paulsen 1103 cultivadas nos vinhedos da Quinta da Neve no município de São Joaquim (Figura 30), foram coletados aleatoriamente nos meses de Dezembro/2003, Janeiro/2004, Fevereiro/2004 e Março/2004. O acompanhamento do desenvolvimento da uva foi realizado com um total de quatro amostragens, através da coleta de 10 cachos em cada amostragem. A coleta teve início no dia 20/12/2003, vinte e cinco dias após a data de floração (26/11/2003). As datas de coleta correspondem a 25, 56, 91 e 127 dias após a floração.



Figura 30: Cabernet sauvignon enxertadas sobre porta-enxerto Paulsen 1103 cultivadas nos vinhedos da Quinta da Neve em São Joaquim.

O vinhedo da Empresa Videcar foi formado em 07 de dezembro de 1999, é conduzido em manjedora com espaçamento entre as plantas de 1,5m e entre as fileiras de 3,3m em uma área total de cultivo de 2,5hectares, plantada exclusivamente com a uva Cabernet sauvignon (Figura 31).

As amostras de uvas Cabernet sauvignon foram coletadas aleatoriamente durante os meses de Dezembro/2003, Janeiro/2004 e Fevereiro/2004. O acompanhamento do desenvolvimento da uva foi realizado com um total de três amostragens, através da coleta de 10 cachos em cada amostragem. O trabalho de coleta teve início em 22 de dezembro de 2003, 53 dias após a floração. As datas de coleta correspondem a 53, 83 e 118 dias após a floração.



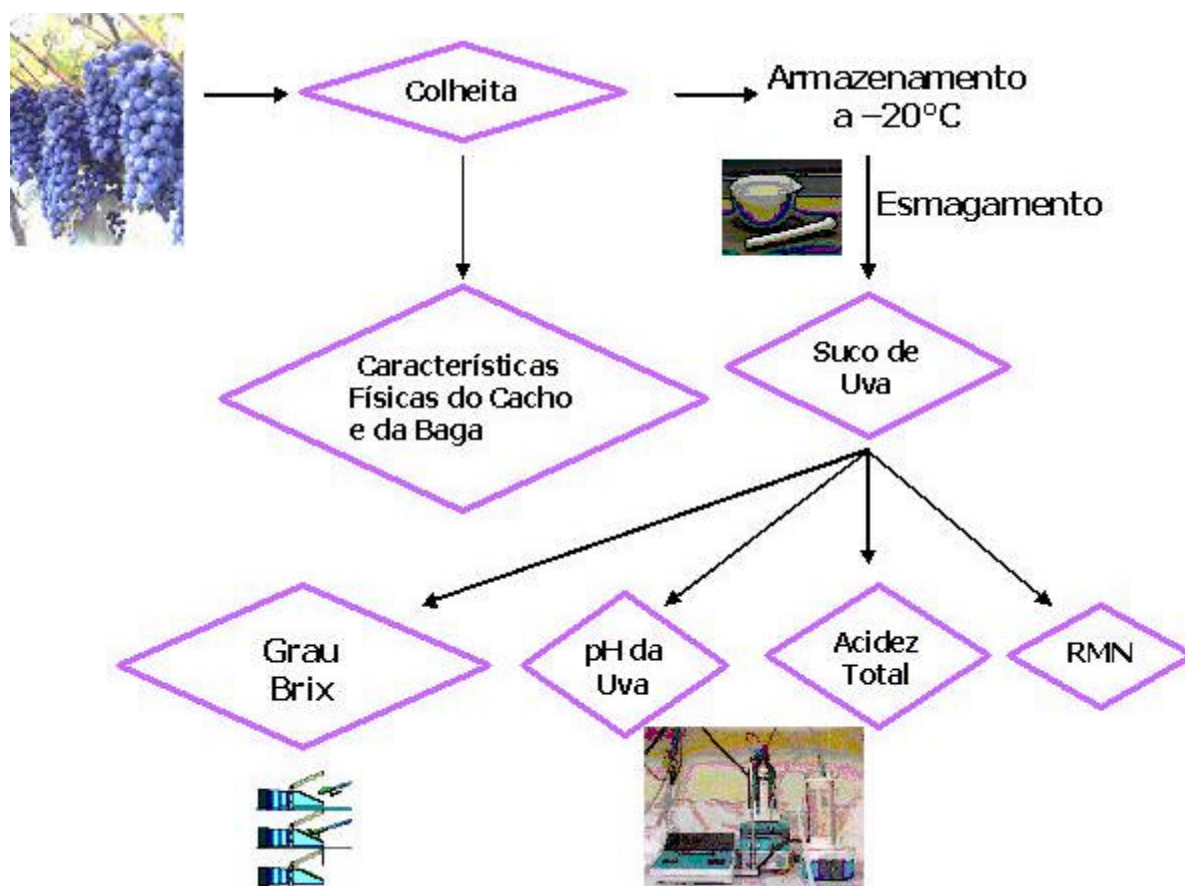
Figura 31: Vinhedo de Cabernet sauvignon, conduzido na forma de manjedora, da empresa Videcar, no município de Videira - SC.

Todas as amostras, após serem coletadas nos vinhedos foram acondicionadas em sacos plásticos, levadas ao laboratório onde 50% das amostras foram imediatamente utilizadas para a determinação de características físicas do cacho (peso, número de bagas por cacho e peso da ráquis) e da baga. As 50% restantes foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a realização das análises de índice de refração, pH, acidez titulável e composição química por RMN. A metodologia experimental está representada no **Esquema 1**.



### 3.4.2 Características Físicas do Cacho e da Baga

As características físicas das uvas: peso do cacho, número de bagas por cacho e peso da ráquis foram determinadas através de medidas efetuadas por ocasião da colheita em 5 cachos colhidos aleatoriamente. As medidas de comprimento da baga foram efetuadas em 150 bagas (30 bagas de cada cacho), com um paquímetro (incerteza de 0,1mm). O peso médio das bagas foi determinado através de medidas de 300 bagas retiradas aleatoriamente desses cachos. Para as medidas físicas da uva foram utilizadas somente uvas frescas, pois de acordo com dados da literatura<sup>7</sup>, há uma alteração significativa da forma e do volume das uvas após o congelamento.



Esquema 1

### 3.4.3 Determinação do Índice de Refração(°Brix), pH e acidez titulável.

O índice de Refração(°Brix), pH e acidez titulável, foram determinados em triplicata no suco das uvas de diferentes cachos (coletados aleatoriamente). O suco foi obtido pelo esmagamento parcial em um mortar das bagas descongeladas (sem esmagar as sementes).

As medidas de °Brix foram feitas em um Refratômetro Alla France® para medir o teor de açúcares solúveis. As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro Hanna modelo 200.

A acidez titulável foi determinada através de titulação potenciométrica e com uso do indicador fenolftaleína, onde a 1,00 ml do suco foi adicionado 25,00 ml de água deionizada em uma célula termostatzada de 100,00 ml. Uma solução de  $1,0\text{molL}^{-1}$  de KOH livre de carbonato foi usada nas titulações dos sucos. A titulação foi efetuada seguindo as recomendações gerais de Martell e Matekaitis<sup>78</sup> sob fluxo de nitrogênio a uma temperatura de 20°C. A força iônica do sistema foi mantida constante. O método de Gran's Plot<sup>4</sup> foi utilizado para determinar a contaminação de CO<sub>2</sub> no sistema, onde encontrou-se 0,32% de CO<sub>2</sub>. As medidas de pH durante a titulação potenciométrica, foram realizadas num equipamento Hanna modelo 200 equipado com um DOSIMAT Metrohm modelo 765.

A titulação do suco de uva, com o uso do indicador fenolftaleína, foi realizada sob as mesmas condições descritas acima.

A acidez titulável (g/100mL) foi calculada em função do ácido tartárico, pela equação 7, onde V é o volume de KOH gasto, M é a sua molaridade e PM é o peso molecular do ácido tartárico<sup>69</sup>.

$$Acidez = V_{KOH} \times M_{KOH} \times PM_{Ac.Tart.} \times 50$$

Equação 7

### 3.4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para os estudos de RMN de estado líquido, utilizou-se 0,400 ml de suco, o qual foi transferido para um tubo de RMN. Neste tubo foi adicionada 0,100 ml de D<sub>2</sub>O com 0,0500% de TMSP (trimetil-silil-propionato de sódio).

Os espectros das amostras de uva preparadas conforme descrição acima, foram obtidos em um espectrômetro de RMN Varian Mercury Plus 400 equipado com um Magneto Oxford e com gradiente de pulso, operando com uma frequência de 400MHz para <sup>1</sup>H e de 100MHz para <sup>13</sup>C, utilizando um probe de 5mm inverso e multinuclear.

Os espectros de 1D RMN foram obtidos com pulso de 45° com tempo de espera entre pulsos (delay time) de 12 segundos com sw (janela espectral) de 6410 Hz e 25125Hz para os experimento de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente. Utilizou-se 16K “ data points” e 256 transientes (scans) para hidrogênio e 35000 scans para carbono. Todas as medidas foram efetuadas a uma temperatura de 25°C e com velocidade de rotação de 20 Hz. O sinal da água no espectro de <sup>1</sup>H RMN (4,7ppm), foi pressaturado através da sequência de pulso PRESAT fornecida pelo equipamento Varian Mercury Plus.

Para a identificação e confirmação dos sinais nas amostras foram adicionados padrões dos compostos em análise, realizados experimentos de DEPT e experimentos de 2D homonuclear (COSY) e hetronuclear (HETCOR, HMBC)

A quantificação das substâncias identificadas nas amostras de uva foi realizada através dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H por comparação da área do sinal da substância de interesse ,com a área do padrão interno utilizado (TMSP) como descreve a Equação 8.

Foram utilizados os seguintes sinais para a quantificação: os sinais 3,34 ppm (multiplete) para a DL-prolina, 1,49 ppm (dubleto) para a DL-alanina, 2,64 e 2,83 ppm (duplos dubletos) para o ácido málico, 3,24 ppm (duplo dubleto) para a â-glicose, 4,11 ppm (dubleto) para a frutose, 5,23 (dubleto) para a á-glicose.

Em todas as amostras o padrão interno estava presente na concentração de  $6,429 \times 10^{-3}$  moles/Litro.

$$C_s \text{ (gL}^{-1}\text{)} = \left\{ \frac{I_s/n_s}{I_{\text{TMSP}}/n_{\text{TMSP}}} \times C_{\text{TMSP}} \right\} \times 1,25$$

Equação 8

Na equação 8,  $C_s$  representa a concentração em  $\text{gL}^{-1}$  do analito nas amostras de uva a ser calculada;  $I_s$  é a área do sinal do analito;  $n_s$  é o número de hidrogênios relativos do analito.  $I_{\text{TMSP}}$  representa a área do padrão interno relativa ao número de hidrogênios do padrão ( $n_{\text{TMSP}}$ ) e  $C_{\text{TMSP}}$  é a concentração conhecida do padrão interno utilizado. O fator de multiplicação de 1,25 se refere a diluição do suco de uva (0,4ml) com 0,1ml de  $\text{D}_2\text{O}$  com TMSP.

#### 3.4.5 Validação da metodologia

A validação da metodologia foi realizada através de testes de recuperação, em que foram realizadas adições dos padrões das substâncias identificadas, em concentrações próximas às determinadas nas amostras.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Limite de detecção e Curva de calibração

#### 4.1.1 Cálculo do tempo de relaxação spin-rede ( $T_1$ ) para o espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla. .

Entre os parâmetros mais importantes de aquisição de espectros RMN de  $^1\text{H}$  está a determinação dos valores  $T_1$ , pois o uso de um tempo de relaxação insuficiente pode gerar resultados errôneos na determinação da quantidade do composto presente em uma amostra. Normalmente, um tempo de espera entre pulso de três a cinco vezes do valor de  $T_1$  é suficiente para alcançar uma completa relaxação dos hidrogênios e eliminar o risco de saturação do sinal<sup>25</sup>.

No entanto, para garantir que os núcleos sejam completamente relaxados e diminuir o tempo de análise pode-se optar pela escolha de um pulso de  $45^\circ$ , ao invés do uso de um pulso de  $90^\circ$ , e um valor de tempo de espera entre pulso de apenas três vezes o maior valor de  $T_1$  encontrado. Haverá uma diminuição da sensibilidade da análise, pois pulsos de  $90^\circ$  geram a melhor relação sinal/ruído. Contudo, deve-se ter em conta a relação tempo de análise e sensibilidade da medida<sup>21</sup>.

Os hidrogênios selecionados em cada substância a serem monitorados nas análises quantitativas por RMN de  $^1\text{H}$ , foram escolhidos analisando-se duas características: (1) sinais com o mínimo de sobreposição com outros sinais da matriz escolhida para análise (suco de uva); (2) sinais com as menores multiplicidades correspondentes aos acoplamentos spin-spin, de forma a obter uma melhor relação sinal/ruído. Sendo assim acredita-se que os sinais selecionados para cada uma das substâncias em análise são os que melhor se enquadram nesses critérios de seleção.

Os valores de  $T_1$  dos hidrogênios selecionados para serem monitorados estão descritos na Tabela 02.

Tabela 02: Valores dos tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) para os hidrogênios a serem monitorados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ .

Compostos químicos	Deslocamento químico em ppm (multiplicidade)	Valor de $T_1$ (segundos)
TMSP	0 ppm (s)	4,01
alanina	1,49 ppm (d)	1,31
prolina	2,34 ppm (m)	2,9
ácido málico	2,64 ppm (dd) e 2,83 ppm (dd)	1,12
â-glicose	3,24ppm (dd)	1,25
frutose	4,11ppm (d)	2,00
á-glicose	5,23 (d)	1,49
etanol	1,17 (t)	3,20

Analisando o dados da tabela 02, estipulou-se que, para obter uma excitação de > 99% dos núcleos dos hidrogênios em experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  com um menor tempo de análise, seria necessário um pulso de  $45^\circ$  e um tempo de espera entre pulsos de 12 segundos. Esses parâmetros devem permitir uma quantificação adequada dos compostos. Para garantir uma melhor relação sinal/ruído e aumentar a sensibilidade das medidas, utilizou-se um número de transientes de 256 (scans) nos experimentos, resultando em um tempo total de 1 hora e 3 minutos para cada análise.

#### 4.1.2 Limite de detecção e curva de calibração para espectrômetro de RMN de 4,7Tesla.

Foi determinado o limite de detecção do aparelho BRUCKER AC 200 F (200 MHz), para o ácido succínico a partir de soluções desse ácido em diferentes concentrações (16,00 – 0,16  $\text{gL}^{-1}$ ). As diluições foram elaboradas partindo sempre da solução estoque<sup>79</sup>.

Foi encontrado um valor de limite de detecção mínimo de 0,2  $\text{gL}^{-1}$  para experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  a 4,7 Tesla. Tomou-se como base para chegar a esses

uma relação sinal/ruído maior ou igual a 3 ( $S/N = 3$ )<sup>73</sup>. A relação sinal/ruído foi calculada através da equação 9, em que A é a altura do sinal escolhido, 2,5 é o fator usado para converter a medida de pico a pico do ruído em *rms* (root-mean-square) que é o desvio padrão da distribuição do ruído ao longo do espectro.  $N_{pp}$  é a medida da amplitude do sinal de ruído (Figura 32)<sup>21</sup>.

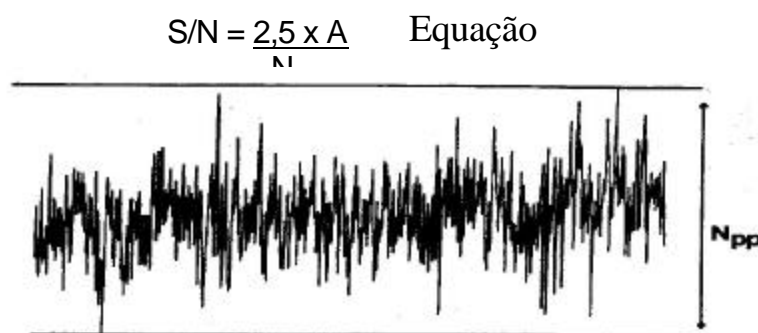


Figura 32: Medida da amplitude do sinal de ruído em um espectro de RMN ( $N_{pp}$ )<sup>21</sup>.

Uma vez delineado os valores de concentrações limites para a substância em estudo (ácido succínico  $0,2\text{gL}^{-1}$ ), foram realizados experimentos a fim de investigar a influência do número de transientes (scans) sobre a medida da área do sinal para a solução de ácido succínico  $0,2\text{ gL}^{-1}$ . Neste estudo foram determinados o desvio padrão e o erro em medidas (3 medidas) em função de diferentes números de scans (64, 128, 256 e 512 scans), como mostra a Tabela 03.

Tabela 03: Valores de área em função do número de transientes (scans) para diferentes medidas do mesmo sinal, em  $2,6\text{ppm}$ .

	64scans (5min)	128scans(15min)	256scans(25min)	512scans (40min)
Experimento	área	área	área	área
medida 1	0,00267	0,00284	0,00290	0,00315
medida 2	0,00239	0,00292	0,00290	0,00311
medida 3	0,00240	0,00292	0,00282	0,00318
valor médio	0,00249	0,00289	0,00287	0,00315
desvio padrão	0,00016	0,00005	0,00005	0,00004
erro %	6,39	1,60	1,61	1,12

Observa-se através dos valores de erro percentual das medidas, que não há uma melhora significativa entre 128 e 256 scans, por esse fato, optou-se pelo uso de

128 scans como parâmetro para aquisição dos espectros. No entanto, uma melhora na precisão das medidas das áreas é observada quando se utiliza um valor de 512 scans, contudo nesse caso, a relação tempo de análise e precisão não é vantajosa.

A partir das mesmas soluções de ácido succínico ( $16 - 0,16 \text{ gL}^{-1}$ ) foi construído um gráfico de área do sinal do ácido succínico (singleto em 2,6 ppm), normalizada com o sinal do padrão de referencia interno TMSP em função da concentração ( $\text{gL}^{-1}$ ) da solução de ácido succínico, como mostra a Figura 33, no qual obteve-se um coeficiente de linearidade  $R = 0,99969$ .

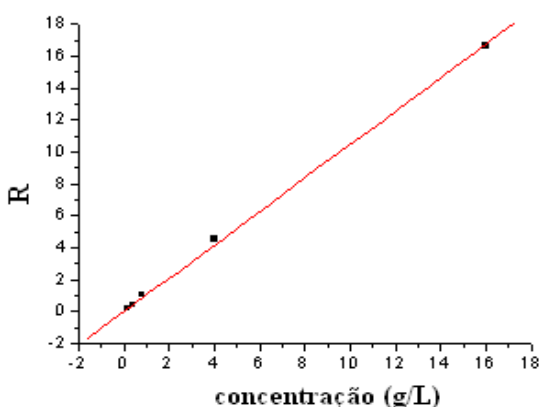


Figura 33: Gráfico de área do sinal do ácido succínico (singleto em 2,6 ppm) normalizada pelo padrão interno em função da concentração ( $\text{gL}^{-1}$ ) da solução de ácido succínico.

O resultado obtido para o coeficiente de linearidade da reta está de acordo com trabalhos descritos na literatura<sup>80,81</sup> e demonstra que a medida direta da área do sinal em um espectro de RMN pode ser associada à concentração de uma dada substância presente em uma amostra, sempre levando em conta a presença de um padrão interno.

#### 4.1.3 Curva de calibração para o espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla.

A Figura 34 mostra os sucessivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos de diferentes soluções á e â glicose, frutose, ácido málico, prolina e alalina como mostra a Tabela 04



Tabela 04: Soluções dos diferentes analitos utilizadas nos estudos da relação entre a área do sinal normalizada e a concentração em  $\text{gL}^{-1}$ .

Análito	Concentrações $\text{gL}^{-1}$
DL-alanina	16,00 – 0,0016
DL-prolina	16,00 – 0,0016
L-ácido málico	40,00 – 0,20
â-glicose	48,00 – 0,078
frutose	120,0 – 0,15
á-glicose	42,00 – 0,042

A partir das medidas foram construídos gráficos de área do sinal para cada substância (normalizada com o sinal do padrão de referencia interno TMSP) em função da concentração em  $\text{gL}^{-1}$  (Figuras 35,36,37,38,39 e 40).

Observou-se um aumento da intensidade e da área do sinal com o aumento da concentração, conforme esperado. Os coeficientes de correlação linear estão apresentados na Tabela 05 para cada substância.

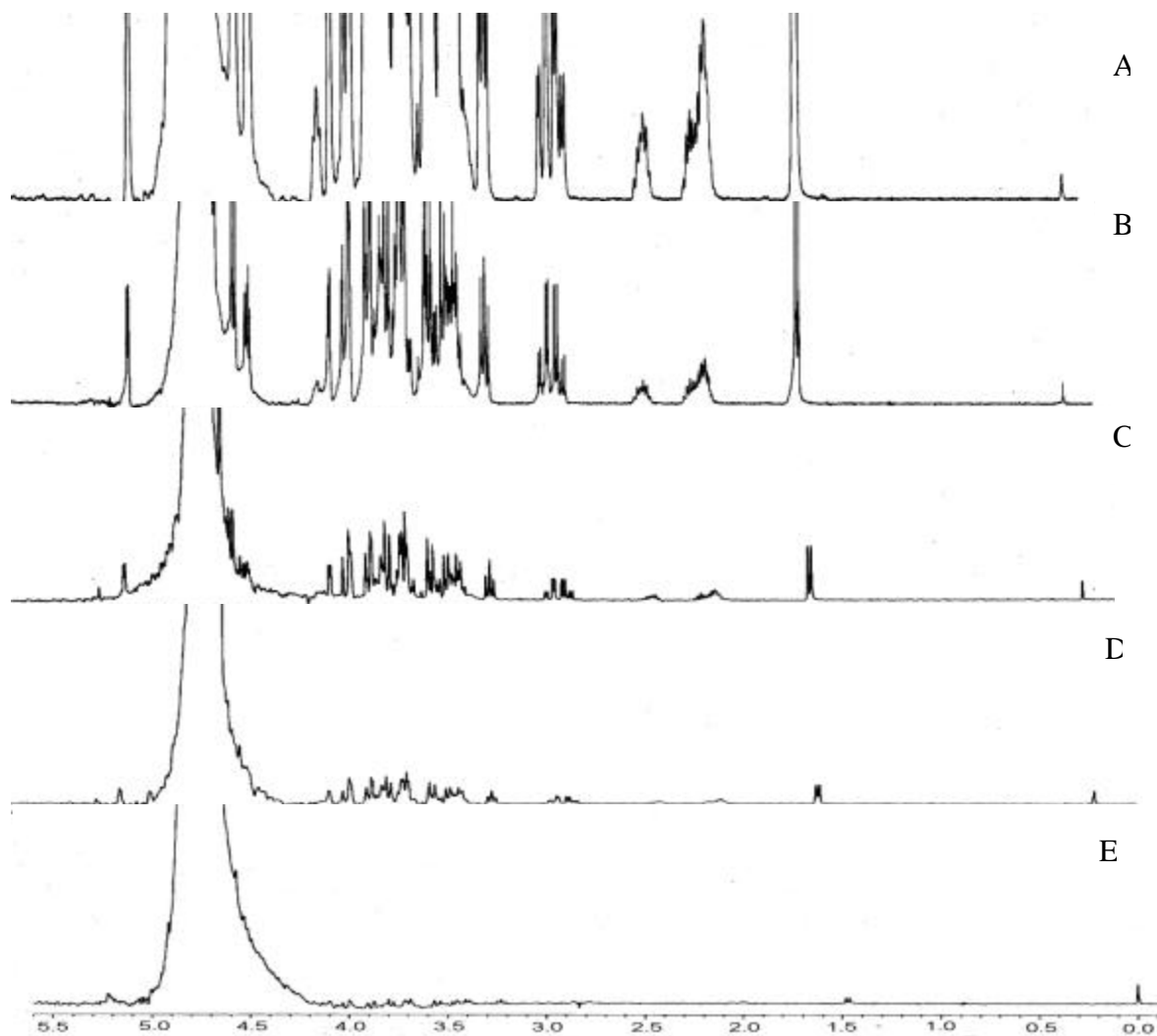


Figura 34: Variação da intensidade e área do sinal no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para as diferentes soluções analisadas. A, (DL-prolina  $16,00\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $16,00\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $40,00\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $78,00\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $42,00\text{gL}^{-1}$  e frutose  $120\text{gL}^{-1}$ ; B, (DL-prolina  $4,00\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $4,00\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $10,00\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $19,50\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $10,50\text{gL}^{-1}$  e frutose  $30\text{gL}^{-1}$ ); C, (DL-prolina  $1,60\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $1,60\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $4,00\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $7,80\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $4,20\text{gL}^{-1}$  e frutose  $12,0\text{gL}^{-1}$ ); D, (DL-prolina  $0,80\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $0,80\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $2,00\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $3,90\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $2,10\text{gL}^{-1}$  e frutose  $6,00\text{gL}^{-1}$ ); E (DL-prolina  $0,16\text{gL}^{-1}$ , DL-alanina  $0,16\text{gL}^{-1}$ , ácido málico  $0,40\text{gL}^{-1}$ ,  $\alpha$ -glicose  $0,78\text{gL}^{-1}$ ,  $\beta$ -glicose  $0,42\text{gL}^{-1}$  e frutose  $1,20\text{gL}^{-1}$ ).

Tabela 05: Coeficiente de regressão linear obtido para cada substância de interesse.

Compostos químicos	Deslocamento químico em ppm (multiplicidade)	Coeficiente de regressão linear
alanina	1,49 ppm (d)	0,99984
prolina	2,34 ppm (m)	0,99880
ácido málico	2,64 ppm(dd) e 2,83 ppm (dd)	0,99893
â-glicose	3,24ppm (dd)	0,99826
frutose	4,11ppm (d)	0,99900
á-glicose	5,23 (d)	0,99613

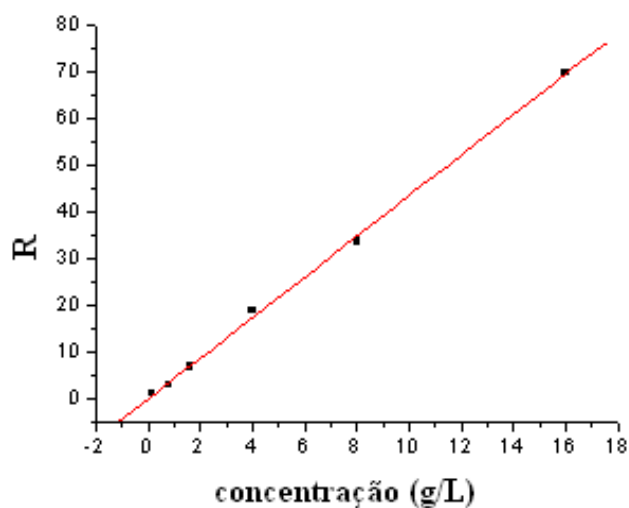


Figura 35: Gráfico da área do sinal, dubleto em 1,49ppm (alanina) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de alanina, em que  $A_s$  é a área da substância em análise e  $A_i$  a área do padrão interno (TMSP).

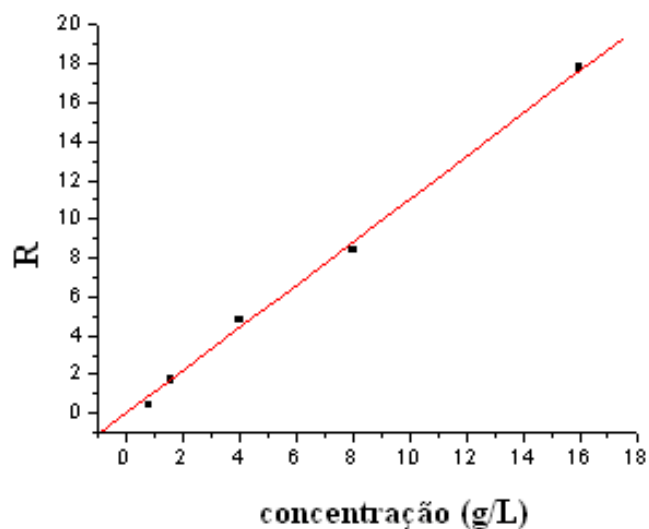


Figura 36: Gráfico da área do sinal, multipeto em 2,36ppm (prolina) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ), em função da concentração de prolina.

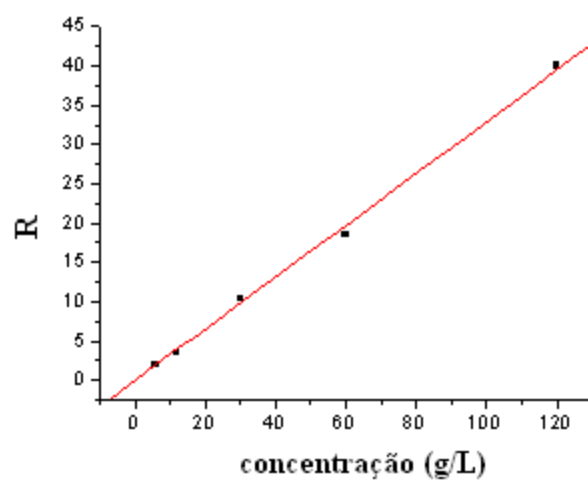


Figura 37: Gráfico da área do sinal, dubleto em 4,11ppm (frutose) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ), em função da concentração de frutose.

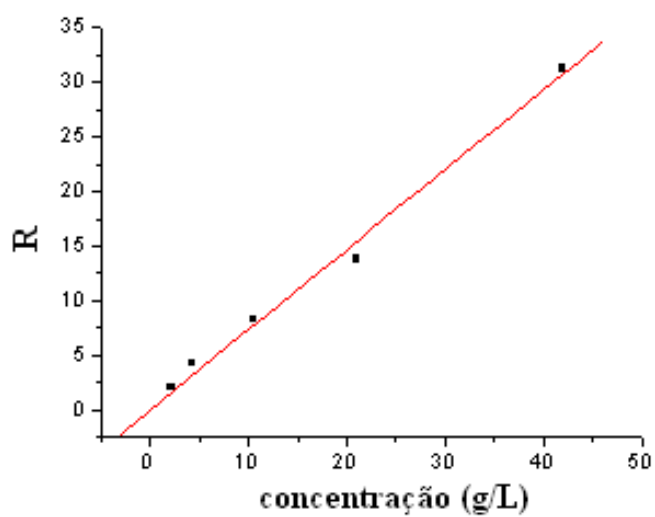


Figura 38: Gráfico da área do sinal, dubleto em 5,23 ppm (á-glicose) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ), em função da concentração de á-glicose.

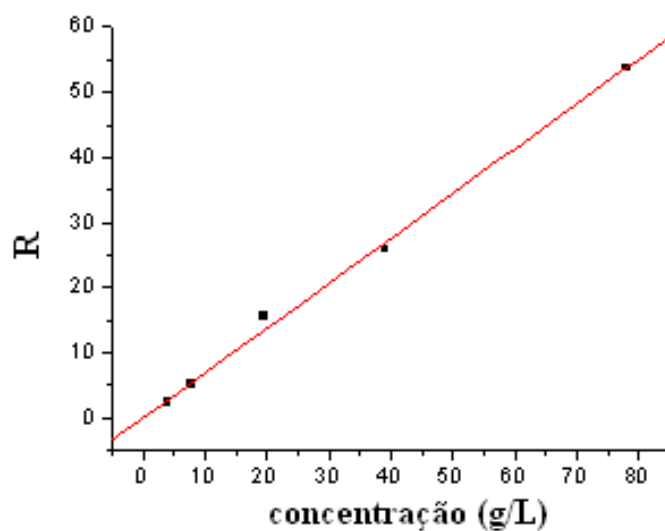


Figura 39: Gráfico da área do sinal, duplo dubleto em 3,24 ppm (â-glicose) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ), em função da concentração de â-glicose.

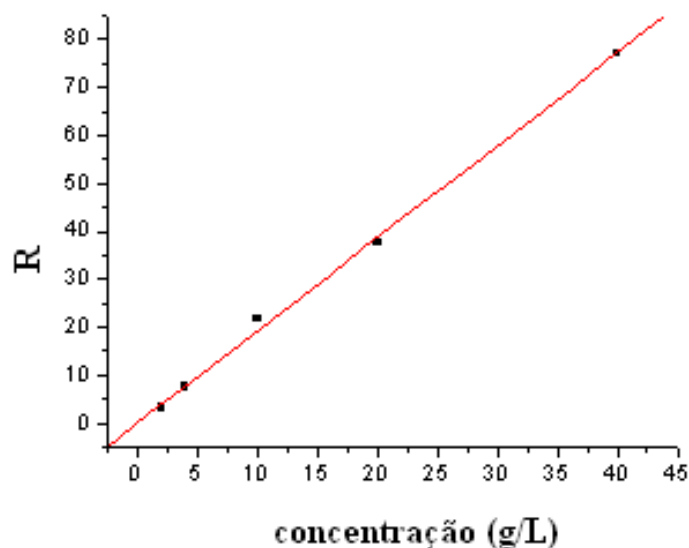


Figura 40: Gráfico da área do sinal, duplo dubleto em 2,63 e duplo dubleto 2,83ppm (ácido málico) normalizada ( $R = A_s/A_i$ ) em função da concentração de ácido málico

Assim como já descrito na literatura e constatado em estudos prévios realizados no espectrômetro de RMN de 4,7 Tesla, a relação área do sinal normalizada por um padrão interno em relação a sua concentração apresentou um comportamento linear, pois a maior parte das substâncias estudadas mostrou um coeficiente de linearidade da reta ( $R$ ) maior de 0,99. Desta forma, pode-se considerar a área normalizada do sinal obtido nas análises de RMN de  $^1\text{H}$  como uma medida direta da concentração de uma dada substância.

Observa-se que à medida que a multiplicidade dos sinais aumenta, de dubleto para duplo dubleto e para multipeto, o coeficiente de linearidade diminui. Tal fato pode ser atribuído à diminuição da relação sinal/ruído em multiplicidades maiores aliado a erros de integração gerados em concentrações próximas ao limite de detecção. Outro fato que afeta o coeficiente linear é a presença de sinais de grande intensidade próximos aos sinais a serem integrados, como observado no caso da  $\alpha$ -glicose em 5,23ppm.

#### 4.1.4 Limite de detecção e limite de quantificação calculado para o espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla.

Foi determinado o limite de detecção do aparelho Varian 400MHz, através da análise de soluções contendo diferentes concentrações dos analitos. Foram usadas duas condições experimentais distintas; com supressão do sinal da água (4,7 ppm) através da técnica de PRESAT e sem a supressão do sinal da água. Esse experimento busca avaliar a influência de um sinal de alta intensidade, oriundo da presença de altas concentrações de uma substância na amostra, sobre os limites de detecção de substâncias em menores concentrações.

Os valores de limite mínimos de detecção e quantificação para as substâncias em estudo, obtidos em experimento de RMN de  $^1\text{H}$  com e sem PRESAT a 9,4 Tesla estão descritos na tabela 06. Os valores de limite mínimo de detecção foram calculados em função da relação sinal/ruído.  $(S/N = 3)^{81}$

Para a determinação do limite de quantificação foi utilizado o critério de precisão e exatidão da medida. Dessa forma, foi definido que o limite de quantificação, fosse o menor sinal medido com precisão inferior ou igual a 5% e exatidão obtida por ensaios de recuperação, com faixa de recuperação de  $100 \pm 20\%^{74}$ . Os resultados de limite de quantificação com seus respectivos valores de precisão estão apresentados nas Tabelas 07 e 08. Os valores de recuperação obtidos estão descritos nas Tabelas 09 e 10.

Tabela 06: Limites de detecção obtidos por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla), sem supressão do sinal da água e com supressão, para as substâncias em análise.

Compostos químicos	Deslocamento químico em ppm (multiplicidade)	Limite de detecção (sem pressaturação) ( $\text{gL}^{-1}$ )	Limite de detecção (com pressaturação) ( $\text{gL}^{-1}$ )
alanina	1,49 ppm (d)	0,16	0,016
prolina	2,34 ppm (m)	1,60	0,40
ácido málico	2,64 ppm (dd) e 2,83 ppm (dd)	2,00	1,00
â-glicose	3,24ppm (dd)	3,90	1,50
frutose	4,11ppm (d)	6,00	3,00
á-glicose	5,23 (d)	2,10	1,00

Tabela 07: Limites de quantificação e precisão das medidas, obtidas em experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) sem supressão do sinal da água.

Compostos químicos	Deslocamento químico em ppm (multiplicidade)	Limite de quantificação ( $\text{gL}^{-1}$ )	Precisão (RSD %)
alanina	1,49 ppm (d)	0,16	1,2
prolina	2,34 ppm (m)	1,60	3,8
ácido málico	2,64 ppm e 2,83 ppm (dd)	2,00	1,6
â-glicose	3,24ppm (dd)	3,90	2,8
frutose	4,11ppm (d)	6,00	3,2
á-glicose	5,23 (d)	2,10	3,5



Tabela 08: Limites de quantificação e precisão das medidas, obtidos em experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) com supressão do sinal da água.

Compostos químicos	Deslocamento químico em ppm (multiplicidade)	Limite de quantificação ( $\text{gL}^{-1}$ )	Precisão (RSD %)
alanina	1,49 ppm (d)	0,016	2,0
prolina	2,34 ppm (m)	0,40	3,6
ácido málico	2,64 ppm e 2,83 ppm (dd)	1,00	1,9
â-glicose	3,24ppm (dd)	1,50	3,0
frutose	4,11ppm (d)	3,00	3,8
á-glicose	5,23 (d)	1,00	4,2

Os valores de precisão das medidas das áreas dos sinais demonstram claramente a influência do grau de multiplicidade dos sinais, pois o maior desvio das medidas foi observado para a prolina, cujo sinal utilizado para a sua identificação foi um multipletto. À medida que a concentração dessa substância diminui, a identificação do sinal é dificultada pelo ruído da linha base.

A presença de sinais laterais provenientes de outras substâncias também interferem na precisão das medidas, como observado para a â-glicose e frutose, na região de 3,00 – 4,50 ppm onde estão localizados os sinais dessas substâncias juntamente com outros sinais, pertencentes a açúcares, ácidos e aminoácidos.

Outro fator que parece interferir na precisão das medidas é a presença de sinais de grande intensidade, como o sinal da água em 4,7 ppm, pois um alto valor de desvio das medidas foi observado para a á-glicose, cujo sinal característico desta substância localiza-se vizinho ao sinal da água.

Tabela 09: Validação da metodologia: Valores do fator de recuperação, para os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) sem supressão do sinal da água.

Compostos químicos	Deslocamento químico em ppm (multiplicidade)	Limite de quantificação ( $\text{g L}^{-1}$ )	Concentração adicionada de cada analito	R %
alanina	1,49 ppm (d)	0,16	0,17	98%
prolina	2,34 ppm (m)	1,60	1,65	94,7%
ácido málico	2,64 ppm(dd) e 2,83 ppm (dd)	2,00	2,01	99,6%
â-glicose	3,24ppm (dd)	3,90	3,86	99,2%
frutose	4,11ppm (d)	6,00	6,13	97,2%
á-glicose	5,23 (d)	2,10	2,03	97,6%

R = fator de recuperação. Proporção da quantidade da substância de interesse adicionada na porção analítica.

Tabela 10: Validação da metodologia: Valores do fator de recuperação, para os experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) com supressão do sinal da água.

Compostos químicos	Deslocamento químico em ppm (multiplicidade)	Limite de quantificação ( $\text{g L}^{-1}$ )	Concentração adicionada de cada analito	R %
alanina	1,49 ppm (d)	0,016	0,018	97,8%
prolina	2,34 ppm (m)	0,40	0,39	92,4%
ácido málico	2,64 ppm (dd) e 2,83 ppm (dd)	1,00	1,05	97,2%
â-glicose	3,24ppm (dd)	1,50	1,53	97,5%
frutose	4,11ppm (d)	3,00	3,08	97,1%
á-glicose	5,23 (d)	1,00	1,02	96,3%

Através dos dados de limite de quantificação, acredita-se que os mesmos fatores relatados para as diferenças obtidas na precisão das medidas para as diferentes substâncias, parecem estar presentes também na determinação do limite de quantificação, pois o menor limite de quantificação foi obtido para alanina em que o sinal monitorado é um dubleto em uma região do espectro desprovida de outros sinais.

Um fator relevante para as análises quantitativas de substâncias presentes em baixas concentrações por RMN de  $^1\text{H}$ , é a existência de sinais de grande intensidade referente a altas concentrações de outras substâncias. Nesse caso o uso de técnicas de supressão do sinal de alta intensidade resulta em uma melhora da relação sinal ruído para a análise do compostos minoritários<sup>82</sup>, como pode ser verificado na Figura 41.

A Figura 41 apresenta a variação da relação sinal/ruído e da intensidade do sinal, para o sinal do ácido málico (dd 2,83 ppm e dd 2,64 ppm) e da alanina (d 1,49 ppm) observados nos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  com e sem supressão do sinal da água.

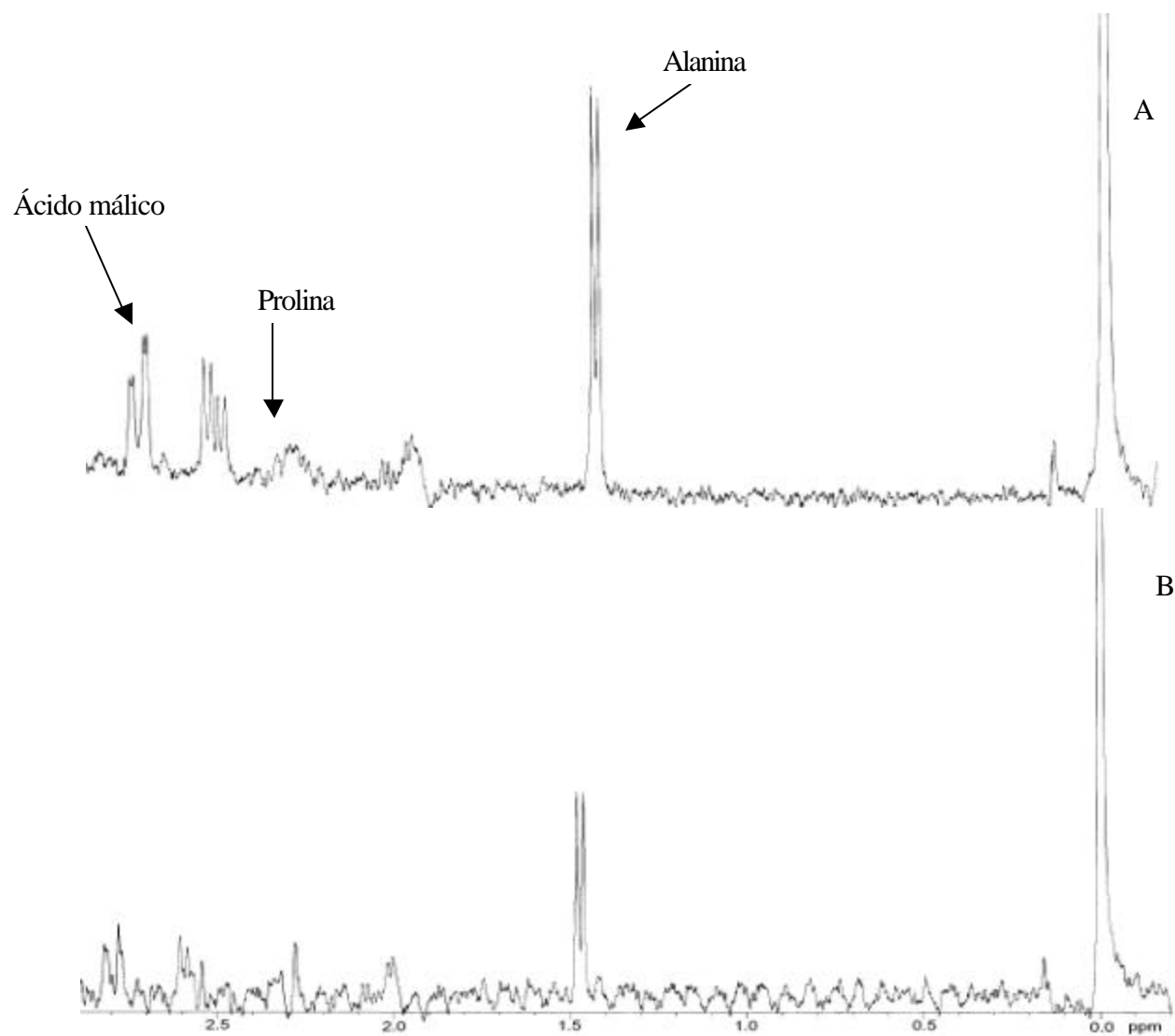


Figura41: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) obtidos com saturação do sinal da água (A), sem saturação do sinal da água (B), de uma solução de  $0,16\text{gL}^{-1}$  de alanina,  $0,16\text{gL}^{-1}$  de prolina e  $0,4\text{gL}^{-1}$  de ácido málico.

## 4.2 Análise de vinhos brancos (Chardonnay) brasileiros por RMN de $^1\text{H}$ (4,7 Tesla)

A uva Chardonnay é largamente difundida em países com diferentes tipos de clima e solo por ser uma uva de fácil adaptação, gerando bons vinhos. No Brasil esta uva é cultivada nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e tem sido usada para a elaboração de espumantes de reconhecida qualidade a nível mundial. Por esse motivo optou-se iniciar os estudos com vinhos elaborados a partir da uva Chardonnay através da análise direta desses vinhos por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ .

### 4.2.1 Análise direta de vinhos brancos (Chardonnay) brasileiros por RMN de $^1\text{H}$ em espectrômetro de 4,7 Tesla.

Todos os estudos apresentados neste capítulo foram realizados em espectrômetro de RMN operando com campo de 4,7 Tesla. Em todos os experimentos a água deuturada foi usada como solvente para aprisionamento do campo e o TMSP como padrão de referência de  $\delta = 0,0\text{ppm}$ .

A Figura 42 mostra os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes amostras de vinhos analisadas. A identificação dos sinais dos componentes detectados é apresentada na tabela 11.

A região de campo alto nos espectros (0,5 – 2,5 ppm) apresenta sinais referentes a compostos como etanol e ácido acético/acetatos. A grande intensidade do sinal do etanol em  $\delta = 1,17\text{ ppm}$ , e a presença de suas bandas laterais em  $\delta = 0,84$  e  $1,43\text{ ppm}$  dificultam a identificação de outros sinais nessa região.

Entre 2,5 e 5,5 ppm os sinais presentes são referentes aos principais ácidos orgânicos encontrados nos vinhos (ácidos málico, succínico e tartárico) como descreve a Tabela 11. No entanto a grande intensidade dos sinais do etanol  $\delta = 3,64\text{ ppm}$  e do glicerol em  $\delta = 3,62$  e  $3,79\text{ ppm}$  causam problemas de sobreposição dos sinais de menor intensidade presentes nessa região. Essas dificuldades de sobreposição de sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  fazem com que a identificação de açúcares, aminoácidos e outros compostos seja dificultada.

A fim de sanar essas dificuldades, foram testadas diferentes formas de concentração de vinhos para a eliminação do etanol, pois o aparelho de RMN utilizado não possibilita a supressão de dois sinais de grande intensidade concomitantemente, em um mesmo experimento. Em todos os experimentos foi utilizada a supressão do sinal da água em 4,7 ppm

Tabela 11: Compostos químicos caracterizados nos vinhos por análise direta, deslocamentos químicos e multiplicidades.

compostos	grupamentos	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	multiplicidade
ácido acético/acetato	$\text{CH}_3$	2.04	s
etanol	$\text{CH}_3$	1.17	t
	$\text{CH}_2$	3.64	q
glicerol	$\text{CH}_2$	3.62	m
	CH	3.79	m
ácido láctico	$\text{CH}_3$	1.35	d
ácido málico	$\text{CH}_2$	2.63	m
	$\text{CH}_2$	2.82	m
ácido succinico/succinato	$\text{CH}_2$	2.59	s
ácido tartárico	CH	4.79	s

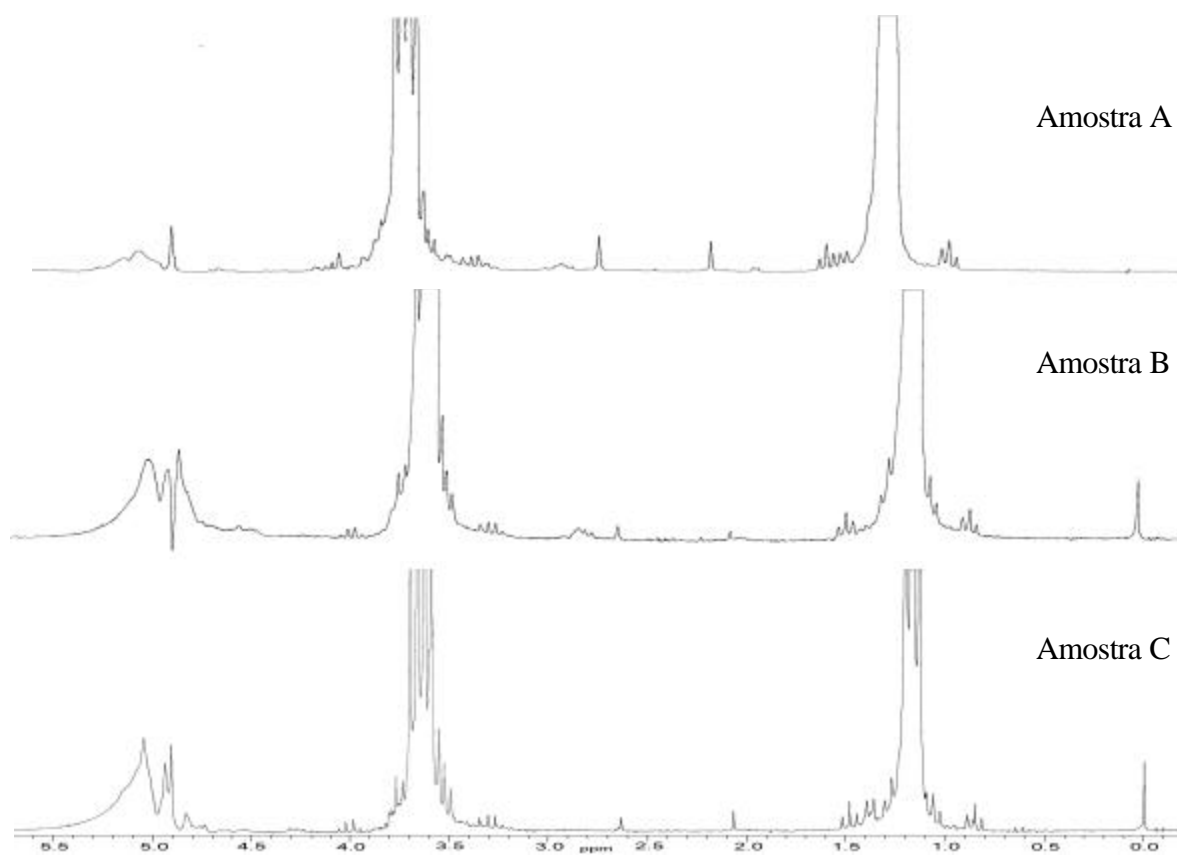


Figura 42: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes amostras de vinhos brancos Brasileiros

#### 4.2.2 Pré-preparo das amostras de vinhos para análise por RMN de $^1\text{H}$ em espectrômetro de 4,7 Tesla.

Inicialmente as amostras de vinhos foram liofilizadas, visto que essa é a técnica de concentração mais citada na análise de vinhos por RMN<sup>9,10,13</sup>. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das diferentes amostras de vinhos, Figura 43, apresentam sinais em 1,17 e 3,64 ppm demonstrando que uma pequena quantidade de etanol ainda se mantém presente nas amostras liofilizadas. Foram também observadas variações de intensidade de sinais quando comparados os espectros dos vinhos liofilizados e sem concentração, especialmente em 2,04 ppm referente ao ácido acético em equilíbrio com os acetatos.

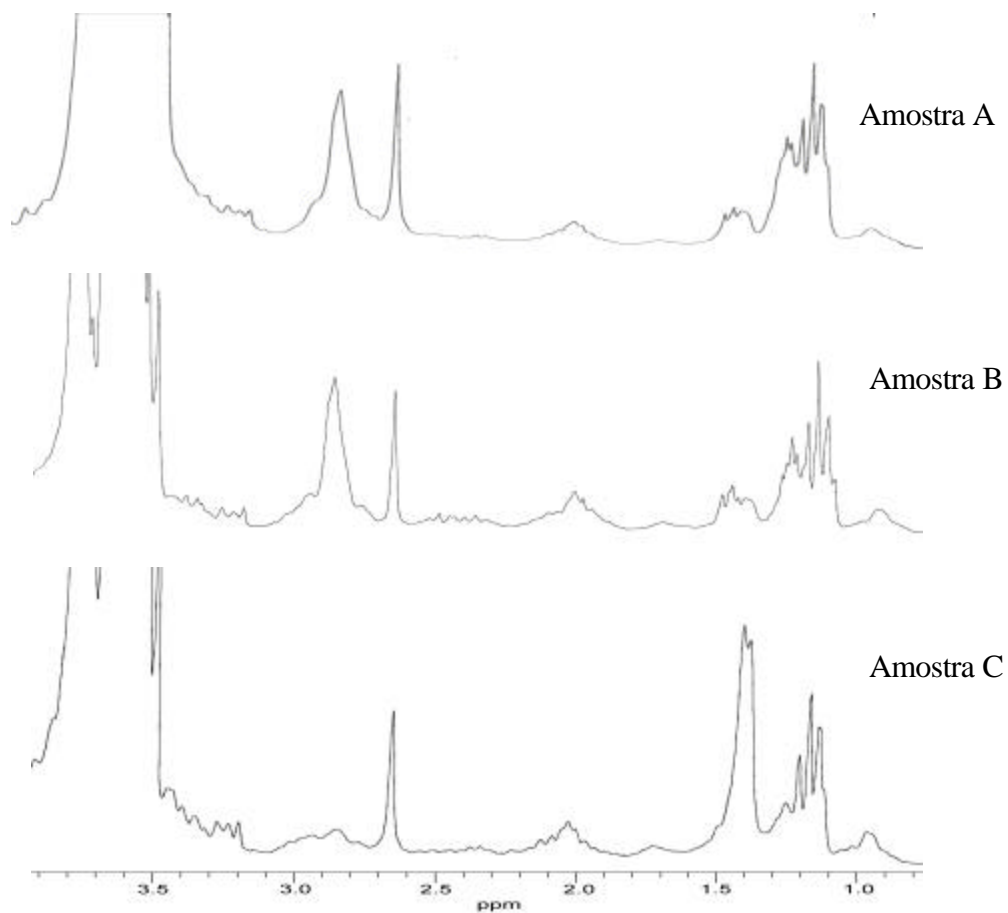


Figura 43: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes amostras de vinhos concentradas por liofilização.



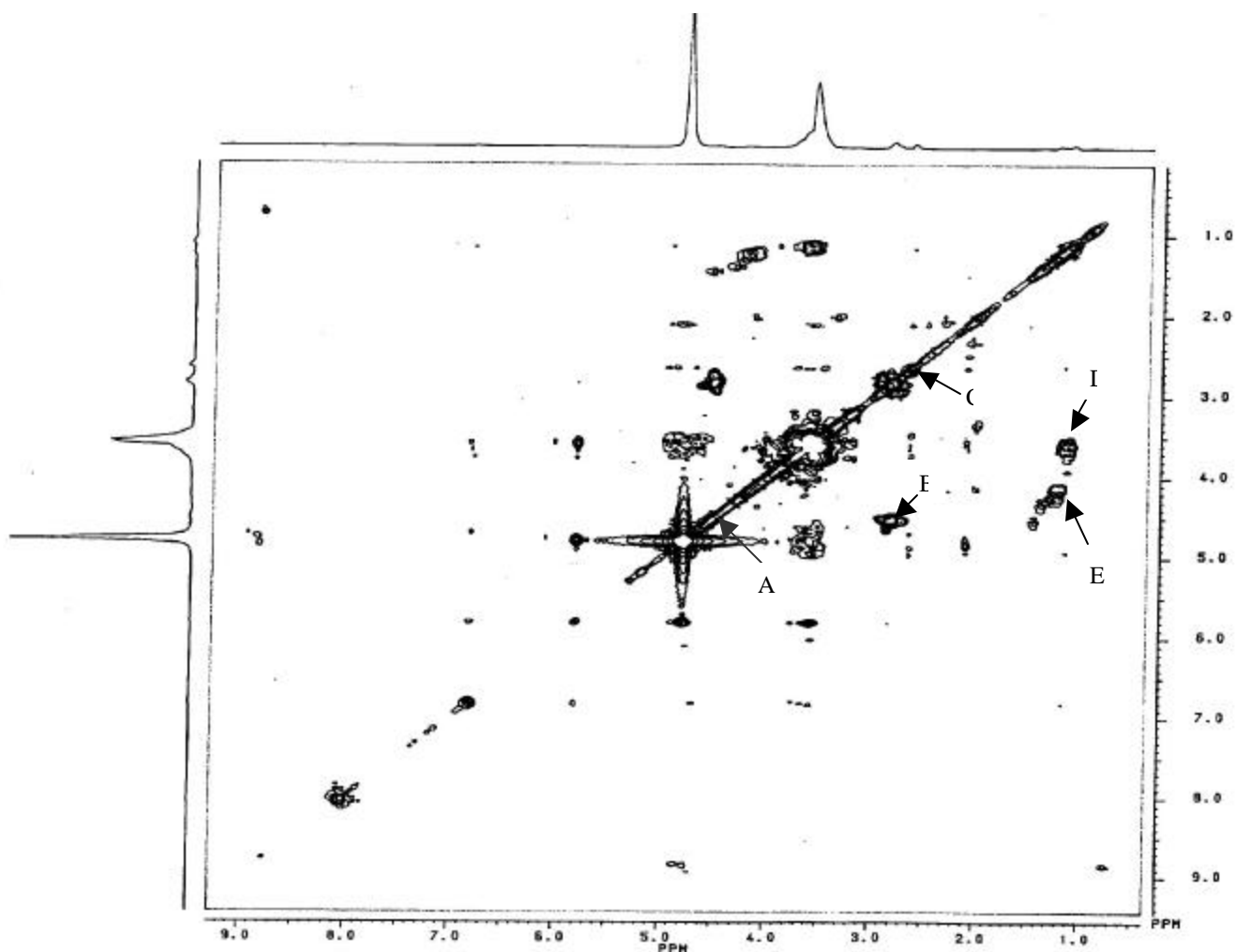


Figura 44: Espectros de RMN de 2D homonuclear COSY H-H da amostra A do vinho liofilizado.

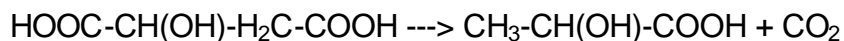
Através de espectroscopia de RMN de 2D homonuclear H-H (COSY) foi confirmado a presença dos principais ácidos orgânicos nas amostras de vinho, e a existência de etanol na amostra liofilizada. Na Figura 44 observa-se que o ácido tartárico, cujo CH ( $\delta = 4,43$  ppm) não apresenta correlação com nenhum outro sinal e está ao lado do sinal da água (A); o ácido málico apresenta correlação do CH<sub>2</sub> em 2,65 e 2,82 ppm com CH em 4,5 ppm (B); o CH<sub>2</sub> do ácido succínico em 2,53 ppm não apresenta correlação com nenhum outro sinal (C); o etanol apresenta correlação CH<sub>3</sub> em 1,15 ppm com CH<sub>2</sub> em 3,6 ppm (D); e o ácido láctico mostra a correlação de 1,35 ppm com 4,20 ppm (E).

Foi observado, assim como já relatado na literatura<sup>9,10</sup>, que as condições da metodologia de liofilização não são facilmente controladas, e que para se alcançar uma boa reprodutibilidade, fatores como pressão e temperatura devem ser rigorosamente controlados.

A concentração dos vinhos brancos brasileiros por meio de fluxo de nitrogênio, revelou a presença de novos sinais entre 1,0 e 1,5 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

Através dessa metodologia foi possível a eliminação total do etanol presente nas amostras. A ausência do etanol foi confirmada pelo desaparecimento do sinal referente a esta substância nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45). Dessa forma foi possível identificar a presença de 2,3 butilenoglicol e alanina cujos dubletos em 1,13 e 1,49 ppm respectivamente, caracterizaram a presença desses compostos. A confirmação foi realizada através da adição de padrão interno das substâncias, como mostrado na Figura 46.

Na região entre 2,0 e 3,4 ppm são observados sinais referentes aos ácidos orgânicos (Tabela 12). Através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  é possível observar até que ponto foi conduzido o processo de fermentação malolática, pelo monitoramento dos sinais do ácido málico (dd : 2,63 ppm, dd: 2,82 ppm) e láctico (d: 1,35 ppm). Esse processo bioquímico no vinho tem o objetivo de diminuir a acidez da bebida (elevar o pH), através da conversão do ácido málico ( $\text{pK}_{\text{a}1}= 3,40$ ,  $\text{pK}_{\text{a}2}=5,02$ ) em láctico ( $\text{pK}_{\text{a}}=3,86$ ) pela ação de bactérias ácido lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, e *Leuconostoc*. O processo está descrito no Esquema 9. Para cada 1g de ácido málico é gerado 0,67g de ácido láctico e 0,33g de  $\text{CO}_2$ , que são os únicos produtos da transformação. Atualmente, os processos bioquímicos conduzidos pela ação de bactérias ácido lácticas, estão sendo estudados através da identificação de metabólitos por espectroscopia de RMN<sup>83,84</sup>.



Esquema 9

Quando a fermentação malolática é realizada de forma a eliminar totalmente o ácido málico, a presença de quantidades significantes de ácido láctico dificulta a identificação do sinal da alanina como mostra a Figura 45 C.

Nos espectros de  $^1\text{H}$  RMN das amostras de vinhos concentradas por fluxo de  $\text{N}_2$ , o glicerol continua a apresentar um sinal de forte intensidade entre 3,5 e 4,0 ppm. A identificação de carboidratos nesse caso é extremamente difícil, devido à sobreposição de sinais. Os compostos identificados são considerados metabólitos primários e secundários da degradação da glicose e frutose, que ocorre durante os processos de fermentação alcoólica e malolática, como exceção do ácido málico que é proveniente da própria uva<sup>85</sup>.

Foi observado que tanto na concentração das amostras por liofilização quanto por fluxo de nitrogênio, não é possível conduzir uma análise quantitativa dos compostos voláteis presentes nas amostras, devido à evaporação dos mesmos durante a concentração.

Tabela 12: Compostos químicos caracterizados nos vinhos submetidos à concentração por fluxo de nitrogênio, deslocamentos químicos e multiplicidades.

compostos	grupamentos	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	multiplicidade
ácido acético/acetato	$\text{CH}_3$	2.04	s
alanina	$\text{CH}_3$	1.49	d
arginina	$\text{CH}_2$	3.26	m
prolina	$\text{CH}_2$	2.35	m
2,3-butilenglicol	$\text{CH}_3$	1.13	d
etanol	$\text{CH}_3$	1.17	t
	$\text{CH}_2$	3.64	q
glicerol	$\text{CH}_2$	3.62	m
	$\text{CH}$	3.79	m
ácido láctico	$\text{CH}_3$	1.35	d
ácido málico	$\text{CH}_2$	2.63	m
	$\text{CH}_2$	2.82	m
ácido succínico/succinato	$\text{CH}_2$	2.59	s
ácido tartárico	$\text{CH}$	4.79	s

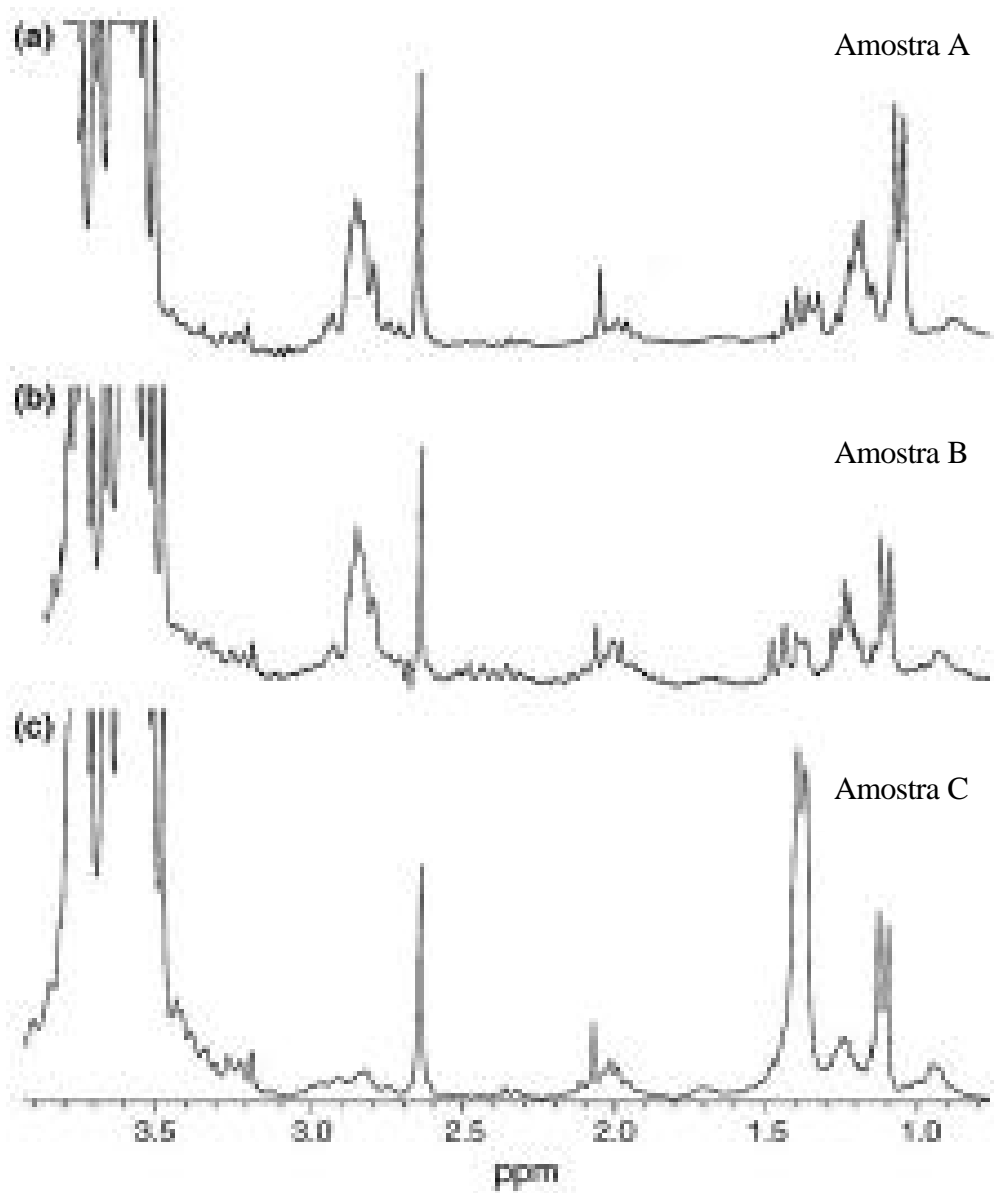


Figura 45: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de diferentes amostras de vinhos concentradas através de fluxo de nitrogênio.

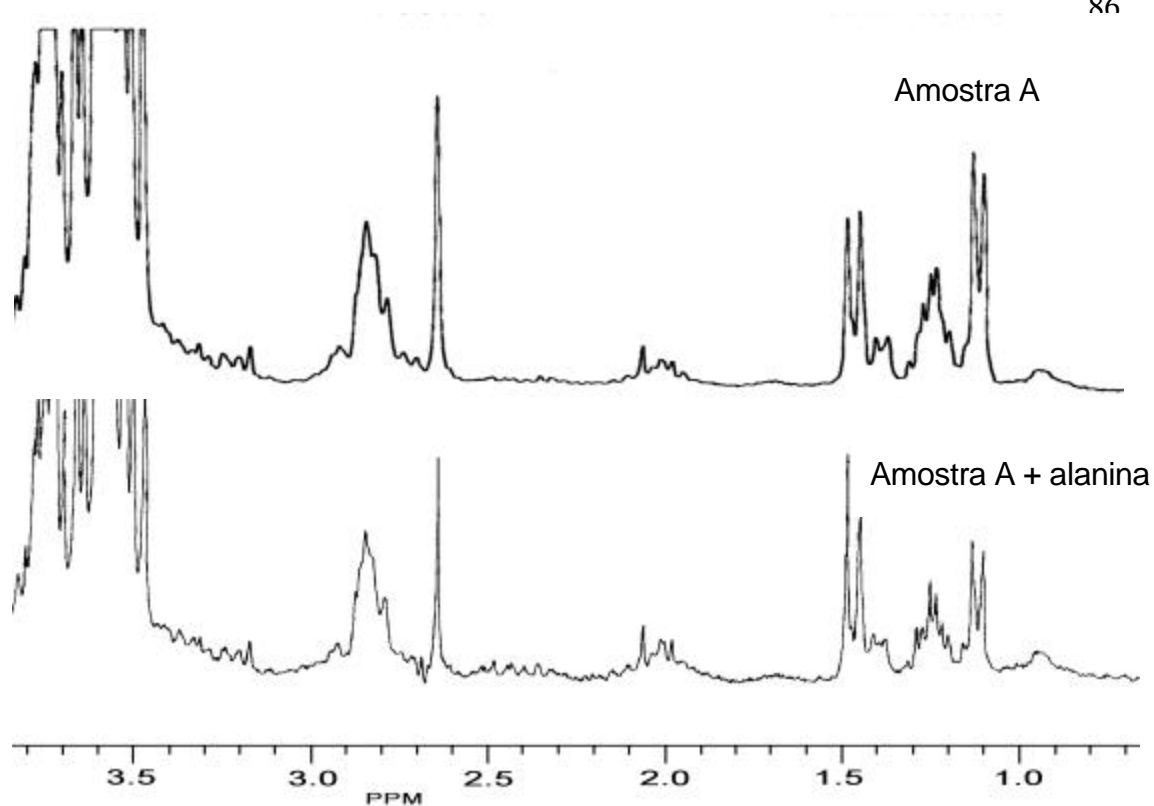


Figura 46: Confirmação da presença da alanina através de adição do padrão da substância.

Durante a análise dos vinhos foi observada a presença de uma pequena quantidade do aminoácido prolina. Em alguns casos a presença desse aminoácido não chegou a ser constatada. Esse fato causou interesse, visto que a prolina é o aminoácido encontrado em maior concentração no vinho de acordo com dados da literatura<sup>69</sup>.

Sendo assim, foi realizada a análise de vinhos da casta Chardonnay, originário de diferentes países, onde a presença da prolina foi identificada mesmo em amostras que não sofreram o processo de pré-concentração como é o caso do vinho branco Uruguaio Castel Pujol, cujo espectro de  $^1\text{H}$  RMN é apresentado na Figura 47.

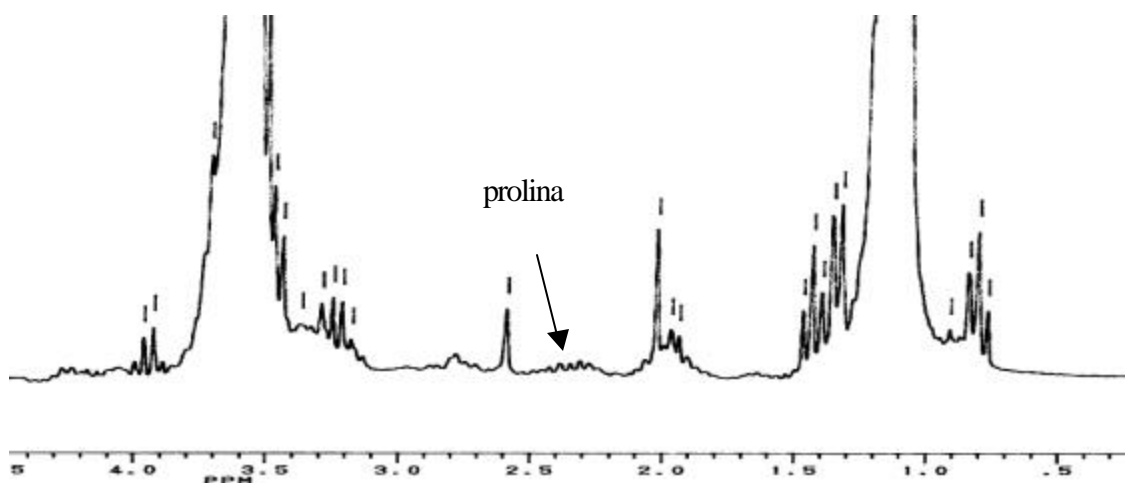


Figura 47: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de vinho branco uruguaio, Castel Pujol, elaborado a partir da uva Chardonnay, sem pré-concentração.

Uma justificativa para a ausência de prolina nas amostras é que processos de filtração e clareamento dos vinhos podem estar sendo conduzidos extensivamente, eliminando grande parte dos aminoácidos presentes na bebida, o que pode afetar a qualidade do vinho.

Essa hipótese é apenas uma suposição, pois os dados obtidos nas análises não foram discutidos com os produtores da bebida devido a dificuldades de contato com as empresas. Todas as amostras eram de vinhos elaborados no Rio Grande do Sul.

Em função desse fato, e da recente plantação de uvas viníferas e elaboração de vinhos finos no estado de Santa Catarina, o trabalho passou a ser conduzido de forma a investigar as potencialidades do uso da técnica de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , na análise de uvas produzidas em São Joaquim e Videira. Para esse estudo foi obtido uma grande abertura e interesse por parte dos produtores catarinenses de uva. Como na elaboração de vinhos de reconhecimento internacional o primeiro passo é a obtenção de uvas de qualidade com alto grau de sanidade, os produtores catarinenses mostraram-se bastante conscientes da importância da interação Universidade – Produtores de Uva e Vinho, para o desenvolvimento de possíveis métodos de controle de qualidade.

#### 4.3 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN (9,4 Tesla), durante o crescimento da uva Chardonnay sob o porta-enxertos Palsen 1103, cultivada no município de São Joaquim.

A uva Chardonnay é largamente difundida mundialmente devido a sua fácil adaptação a vários tipos de solo e clima. Sua notoriedade se faz na elaboração do Champagne na região de Champagne e de vinhos brancos secos da região da Borgonha na França, no entanto, outros países como Estados Unidos (Califórnia), Austrália e Chile vêm desenvolvendo grandes vinhos a partir dessa uva<sup>60,74</sup>. No Brasil a uva Chardonnay juntamente com a Rieseling são as espécies *Vitis vinifera* brancas mais plantadas no território nacional. No estado de Santa Catarina a Chardonnay é uma cultivar pouco difundida. No município de São Joaquim, apenas o vinhedo Quinta da Neve cultiva esta variedade de uva.

O Vinhedo Quinta da Neve se localiza no município de São Joaquim, na localidade de Bentinho, conhecida popularmente como Lomba Seca devido a ocorrência dos menores índices de pluviosidade da região. Os vinhedos estão a uma altitude média de 1200 metros a uma latitude de 28°30'6" ao sul e longitude de 50°6'35" a oeste, com solo argiloso. A Figura 48 mostra a região de localização do vinhedo Quinta da Neve.

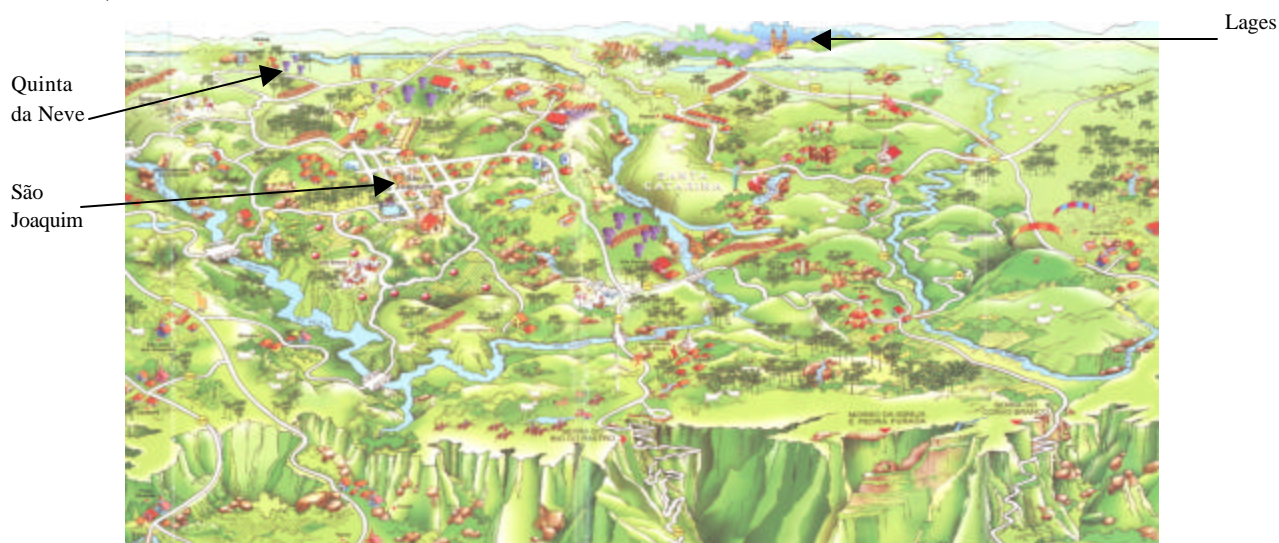


Figura 48: Mapa da Serra Catarinense

### 4.3.1 Características Físicas

A uva Chardonnay caracteriza-se como uma espécie vigorosa, relativamente sensível às variações de clima. Sua brotação é precoce, por este fato está sujeita a queimas causadas por geadas ocasionais durante a primavera. Esta uva apresenta um ciclo vegetativo longo, gerando uma maturação tardia<sup>57</sup>.

A evolução do peso médio dos cachos, do número de bagas por cacho e do peso da ráquis nos quatro diferentes estágios de desenvolvimento estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Características físicas da uva Chardonnay cultivada sob o porta enxerto Paulsen 1103 no município de São Joaquim.

Estágios de desenvolvimento <sup>A</sup>	Peso médio do cacho (SD) <sup>B</sup>	Número de bagas por cacho (SD) <sup>B</sup>	Peso médio da ráquis (SD) <sup>B</sup>	Peso médio do bago de uva (SD) <sup>B</sup>
6 dias	11,9183g (±8,6)	114 (±6)	2.3104g (±0,35)	0.0844g (±0,0782)
35 dias	45,9595g (±5,08)	100 (±27)	3.8202g (±0,49)	0.4886g (±0,1645)
65 dias	97,0285g (±2,90)	109(±11)	7.0547g (±0,64)	0.8264g (±0,1139)
101 dias	139,3807g (±43,50)	87(±26)	6.0397g (±2,29)	1.5324g (±0,13)

A) Dias após a floração

B) SD: Desvio padrão

Um aumento no peso médio da baga foi observado entre 65 e 101 dias. O peso médio final da baga da uva Chardonnay foi de 1,5324g, bagas com peso inferior a 2,0g são consideradas bagas pequenas para *Vitis viníferas*<sup>86</sup>. A uva Chardonnay normalmente apresenta bagas de tamanho variando, de médio a pequeno. Deve-se considerar que o peso da baga durante o crescimento do fruto está relacionado com o número de sementes, com o acúmulo de açúcar no fruto e com o nível de umidade do solo e da atmosfera<sup>87</sup>. Deficiência hídrica entre a floração e o início da maturação pode causar uma redução no tamanho final da baga<sup>87</sup>. Por outro lado, elevada precipitação pluviométrica no final do período de maturação, após um período de seca, provoca



considerável aumento no tamanho da baga. Em princípio, bagas pequenas favorecem a liberação de maior quantidade de minerais para o mosto, especialmente potássio, cálcio e magnésio, que interferem na formação de sais dos ácidos orgânicos e, conseqüentemente no pH e na acidez titulável do vinho<sup>86,87</sup>.

O peso da baga, embora seja uma característica varietal, pode variar de 25% a 30% em função da safra. Geralmente a baga atinge seu peso máximo quando a concentração de açúcar é mais elevada<sup>88</sup>.

A Figura 49 apresenta os gráficos de distribuição do tamanho da baga (comprimento em mm) em função do número percentual de bagas, em medidas realizadas em 4 cachos. Durante os primeiros estágios de crescimento 6, 35 e 65 dias após a floração, as bagas parecem mostrar uma maior variação de tamanho, tal fato tende a ser minimizado à medida que as uvas atingem o período de colheita, 101 dias após a floração. O gráfico da relação número percentual de bagas em função do comprimento apresenta uma distribuição monomodal com 56% das bagas com tamanho entre 12,00 – 13,99 mm de comprimento.

As Figuras 50 e 51 mostram os cachos da uva Chardonnay cultivada sobre o porta-enxerto Paulsen 1103 nas datas correspondentes a 65 e 101 dias após a floração.

35 dias após a floração

65 dias após a floração

101 dias após a floração

Figura 49: Gráfico de distribuição do comprimento da baga (mm) em função do número percentual de bagas da uva Chardonnay sob o porta-enxerto Paulsen 1103, nos diferentes estágios de desenvolvimento (6, 35, 65, 101 dias após a floração)



Figura 50: Cacho de uvas Chardonnay do vinhedo Quinta da Neve em 22/01/2004 (65 dias após a floração).



Figura 51: Cacho de uvas Chardonnay do vinhedo Quinta da Neve em 26/02/2004 (101 dias após a floração).

Os cachos da uva Chardonnay mostraram-se pequenos e compactos e não apresentaram grande variação de tamanho entre 65 e 101 dias após a colheita, como pode ser observado nas Figuras 50 e 51. No entanto, as bagas apresentaram um considerável aumento de peso e tamanho.

#### 4.3.2 Determinação de Grau Brix

As quantidades de açúcares presentes em amostras de frutas são medidas normalmente, através do índice de refração que é proporcional à concentração, em percentagem de sólidos dissolvidos em soluções aquosas (grau Brix).

No caso das uvas, 90% dos sólidos totais são os açúcares glicose e frutose que representam, na época da colheita, 99% dos carboidratos presentes no mosto. Os açúcares representam 12 – 27% do peso das uvas maduras<sup>89</sup>.

A Figura 52 apresenta o gráfico os valores médios do °Brix em função da data de coleta das amostras.

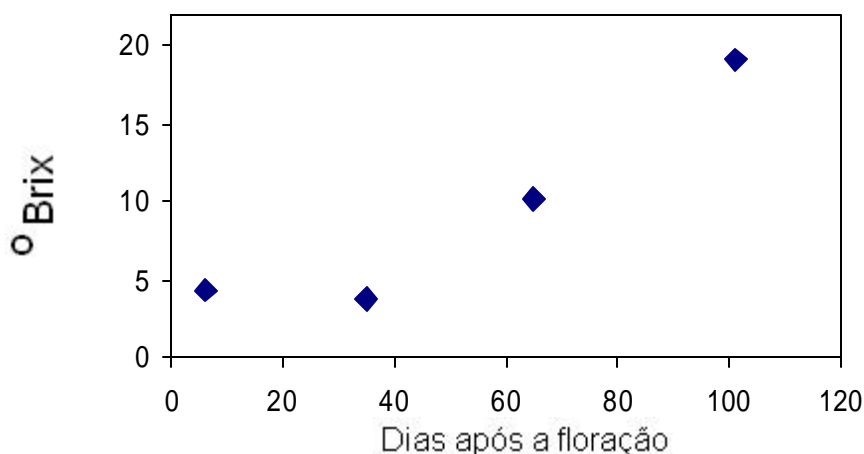


Figura 52: Valores médios do grau Brix em função da data de amostragem para a uva Chardonnay.

Através do gráfico (Figura 52) observa-se uma pequena diminuição do °Brix entre as datas de 6 e 35 dias após a floração. Acredita-se que a queda na concentração dos sólidos totais seja ocasionada pelo aumento do volume do grão (0,085g para 0,48g), que pode estar associada a um aumento da circulação da água no fruto transportada em grande parte através do sistema xilema. Nessa mesma época ocorre uma baixa síntese de açúcares nos frutos e a combinação desses dois fatores pode gerar uma diluição dos açúcares na uva<sup>90</sup>.

Entre 35 e 65 dias após a floração, observa-se um considerável aumento do ° Brix, supõe-se que nessa etapa, a uva entre no estágio de desenvolvimento chamado de veração. Esse estágio é caracterizado pela diminuição da circulação de nutrientes via xilema, e um aumento da atividade do floema. Esse sistema vascular é o principal responsável pelo transporte de açúcares das folhas ao fruto<sup>90,91</sup>. Fisicamente, a fase de veração é caracterizada pelo início de mudança de coloração da uva.

A Figura 53 esquematiza as fases de desenvolvimento da uva, na qual é demonstrada a variação da atividade nos diferentes sistemas vasculares do fruto e as variações de tamanho da baga em função da data de desenvolvimento, expressa em dias após a floração<sup>91</sup>.

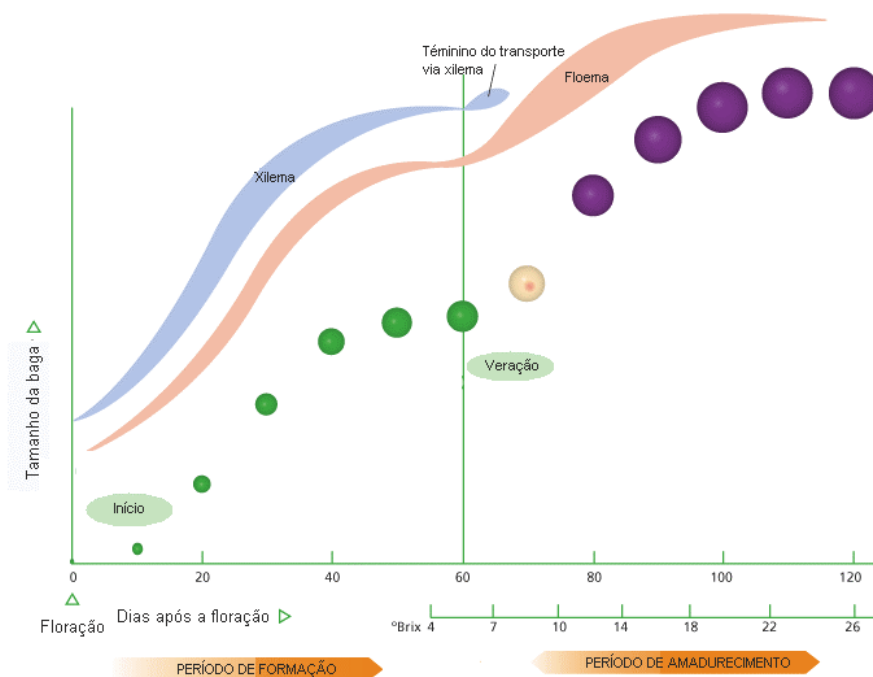


Figura 53: Diagrama apresentando o desenvolvimento da uva com intervalo de 10 dias após a floração, indicando as diferenças nas atividades dos sistemas vasculares. Figura adaptada de referência 91.

#### 4.3.3 Determinação de pH e acidez titulável

A acidez do suco da uva pode ser avaliada através do pH aparente, que representa a concentração de hidrogênio iônico na amostra. O pH da uva e do vinho depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos, bem como da concentração de cátions, especialmente do potássio<sup>92</sup>.

O pH do suco é de grande importância sanitária para a vinificação, pois altos valores de pH podem proporcionar o crescimento de microorganismos indesejáveis, prejudicando a qualidade do suco destinado à produção de vinhos de qualidade. O pH também interfere nos processos fermentativos e nas qualidades organolépticas, como a estabilidade de cor<sup>93-95</sup>.

Na Figura 54 são apresentados os valores de pH médio observados durante o desenvolvimento da uva Chardonnay.

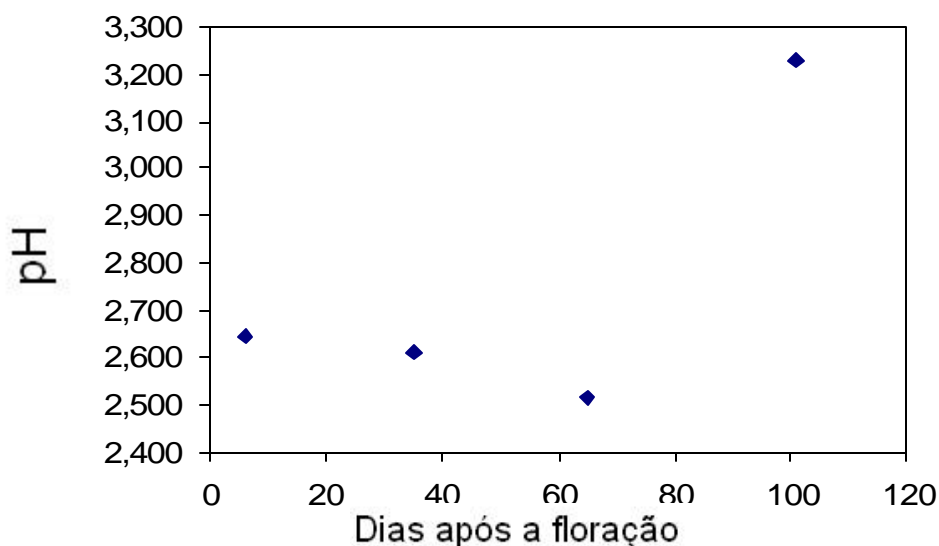


Figura 54: Valores médios do pH em função das datas de coletas.

Através do gráfico de pH, observa-se um decréscimo dos valores de pH do suco até 65 dias após a floração e um aumento significativo de 2,5 para 3,2 na última data de coleta.

Acredita-se que a diminuição do pH deva-se à síntese de ácidos orgânicos, especialmente málico e tartárico que ocorre no período que antecede a fase de maturação da uva. Próximo ao período de veração (início da maturação) das uvas, as quantidades de ácido málico e tartárico tendem a ser equivalente. O aumento do pH

observado entre 65 e 101 dias após a floração pode estar associado a fatores como diluição dos ácidos em função do aumento do volume da baga, o aumento da concentração de íons potássio na uva ou ainda pela diminuição da concentração do ácido málico, consumido durante o processo de respiração oxidativa sofrida pela fruta. O ácido tartárico é mais estável aos processos respiratórios e por este fato, é menos afetado pelas variações de temperatura, sua concentração permanece relativamente constante durante a fase de maturação da uva<sup>96</sup>.

A acidez titulável é uma medida dos íons de hidrogênios consumidos através da titulação da solução de interesse, com uma base padrão até o ponto final da titulação.

Os ácidos orgânicos presentes no suco da uva e no vinho são relativamente fracos, apresentam valores de constante de dissociação ( $K_a$ ) na ordem de  $10^{-4}$ , nesse caso a neutralização da solução com uma base forte, como hidróxido de potássio, é esperado em valores pH superiores a 7. A metodologia de AOAC fixou esse valor de pH em 8,2, ou o uso do indicador fenolftaleína como ponto final da titulação. A acidez titulável pode também ser medida através da construção de um gráfico de pH versus a quantidade de base adicionada na solução<sup>97</sup>.

Nesse trabalho foram realizadas as duas medidas de acidez titulável (Tabela 14), através do uso de indicador fenolftaleína e pela construção de um gráfico de pH versus quantidade de base adicionada. Observou-se que o uso do indicador fenolftaleína mostrou valores de acidez (expressa em gramas de ácido tartárico por 100 mL de solução) superiores aos valores obtidos por potencimetria, o que pode ser atribuído ao fato de que a faixa de viragem do indicador situa-se entre pH de 8,2 – 9,8. O ponto de equivalência calculada através de curvas de titulação potenciométrica ocorreu abaixo desses valores de pH.

Tabela 14: Valores da acidez titulável durante o desenvolvimento da uva Chardonnay sobre o porta-enxerto Paulsen 1103.

Data*	Acidez Total <sub>Fenolf.</sub> (g/100mL $\pm$ SD)	Acidez Total <sub>Potenc</sub> (g/100mL $\pm$ SD)
6 dias	2,32 $\pm$ 0,04	2,05 $\pm$ 0,02
35 dias	2,20 $\pm$ 0,07	2,15 $\pm$ 0,07
62 dias	2,54 $\pm$ 0,02	2,54 $\pm$ 0,02
101 dias	0,73 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,01

\* Dias após a floração

Os valores de acidez titulável (Tabela 14) são inversamente proporcionais aos valores observados de pH (Figura 54). O mesmo tipo de comportamento é observado para as duas análises, com uma maior variação de acidez entre 65 e 101 dias após a floração.

#### 4.3.4 Determinação qualitativa e quantitativa da composição química por ressonância magnética nuclear.

Todos os experimentos apresentados nesse capítulo foram realizados em um espectrômetro de RMN operando com um campo de 9,4 Tesla. Em todas as amostras a água deuterada foi usada para o aprisionamento do campo. O TMSP na concentração de  $6,429 \times 10^{-3}$  moles/Litro, foi usado como padrão de referência para os deslocamentos químicos  $\delta = 0,0$  ppm e como padrão interno nas análises quantitativas.

A avaliação da composição química durante o crescimento e amadurecimento das uvas *Vitis viniferas*, tem sido objetivo de estudo de vários pesquisadores. Grande parte desses estudos, normalmente está concentrado na identificação e quantificação de açúcares e ácidos orgânicos, visto que esses são os principais constituintes da uva e que determinam a época ideal para a colheita das uvas destinadas à elaboração de



vinhos de qualidade. Em termos gustativos, o equilíbrio entre a acidez e a quantidade de açúcares é um dos parâmetros que determina a qualidade do vinho<sup>98</sup>.

Muitos estudos têm demonstrado que as variações de composição química das uvas durante o crescimento e maturação, são dependentes das condições de plantio, clima e tipo de cultivar.

As análises de açúcares e ácidos orgânicos em frutas são normalmente realizadas a partir da separação da parte líquida das frutas, seguida de técnicas de extração líquido-líquido e posterior análise por métodos cromatográficos, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nesse método são necessários procedimentos específicos de extração e separação, e diferentes condições de análise para cada classe de molécula a ser investigada. Deve-se levar em conta que procedimento de extração, purificação e derivatização podem gerar incertezas qualitativas e quantitativas nas análises<sup>99 - 101</sup>.

Estudos com espectroscopia de RMN realizados em alimentos têm apresentado, sob certos aspectos, vantagens quando comparados com as técnicas cromatográficas. O uso da RMN de  $^1\text{H}$  tem possibilitado análise rápida e simultânea de vários compostos presentes em amostra de alimentos, uma vez que as análises são realizadas sem etapas de pré-tratamento das amostras (purificação, concentração e derivatização). Substâncias desconhecidas podem ser identificadas com o auxílio de técnicas de pulso como DEPT HETCOR, HMBC e COSY.

A Figura 55 apresenta os espectros (0 a 8ppm) de RMN de  $^1\text{H}$  dos sucos obtidos nas diferentes fases de desenvolvimento das uvas Chardonnay cultivada sob o porta-enxerto Paulsen 1103, em que foi aplicada a técnica de supressão do sinal, para o sinal da água.

Os sinais que aparecem entre 0 ppm e 8 ppm, correspondem aos metabólitos da uva. Os espectros apresentam sinais de maior intensidade, referentes aos compostos majoritários (glicose, frutose e ácido málico), os sinais de menor intensidade são correspondentes aos compostos minoritários (polifenóis e aminoácidos). A fim de obter uma completa identificação dos sinais, foram utilizados experimentos complementares de RMN de 1D e 2D. Dados da literatura bem como adição de padrões foi utilizada

como guias na identificação de compostos. Um resumo dos sinais identificados é apresentado na Tabela 15.

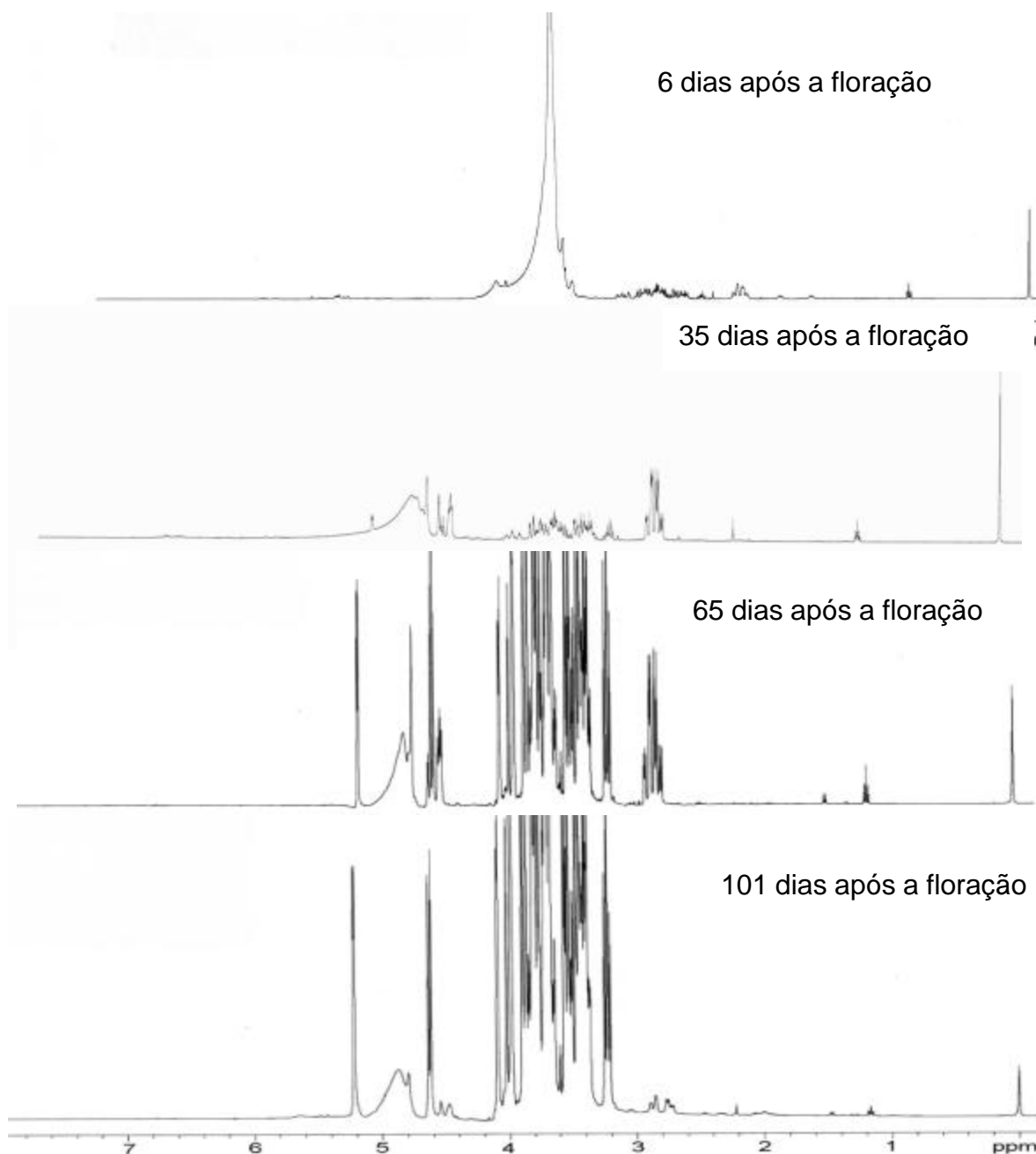


Figura 55: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) da uva Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento (6, 35, 65 e 101 dias após a floração) .

Tabela 15: Deslocamento químico ( $^1\text{H}$ ) e multiplicidade dos metabólitos da uva.

$^1\text{H}$ deslocamento químico (ppm): multiplicidade	compostos: identificação estrutural
1.17: t	etanol: $\text{CH}_3$
1.49: d	alanina: $\text{CH}_3$
2.01: s	ésteres derivados de acetatos: $\text{CH}_3$
2.36: m	prolina: $\text{CH}_2$
2.64: dd	ácido málico: $\alpha\text{-CH}_2$
2.83: dd	ácido málico: $\alpha\text{-CH}_2$
3.24: dd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H2
3.40: dd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H4
3.41: dd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H4
3.46: ddd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H5
3.49: t	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H3
3.53: dd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H2
3.65:	etanol: $\text{CH}_2$
3.72: dd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : $\text{CH}_2\text{-C6}$
3.76: dd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : $\text{CH}_2\text{-C6}$
3.82: m	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H5
3.82: m	$\alpha\text{-D-glicose}$ : half $\text{CH}_2\text{-C6}$
3.89: dd	$\alpha\text{-D-glicose}$ : half $\text{CH}_2\text{-C6}$
4.11: d	$\alpha\text{-D-frutose}$ : H3
4.43: s	ácido tartárico: CH
4.64: d	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H1
5.23: d	$\alpha\text{-D-glicose}$ : H1

Em todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  o sinal da água (4,7ppm) foi minimizado, através de uma saturação seletiva do sinal com um único pulso.

A região de alto campo do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que se estende de 0 a 3,0ppm (Figuras 56) contém normalmente, sinais originários de hidrogênios de grupos alifáticos de ácidos orgânicos, aminoácidos e etanol.

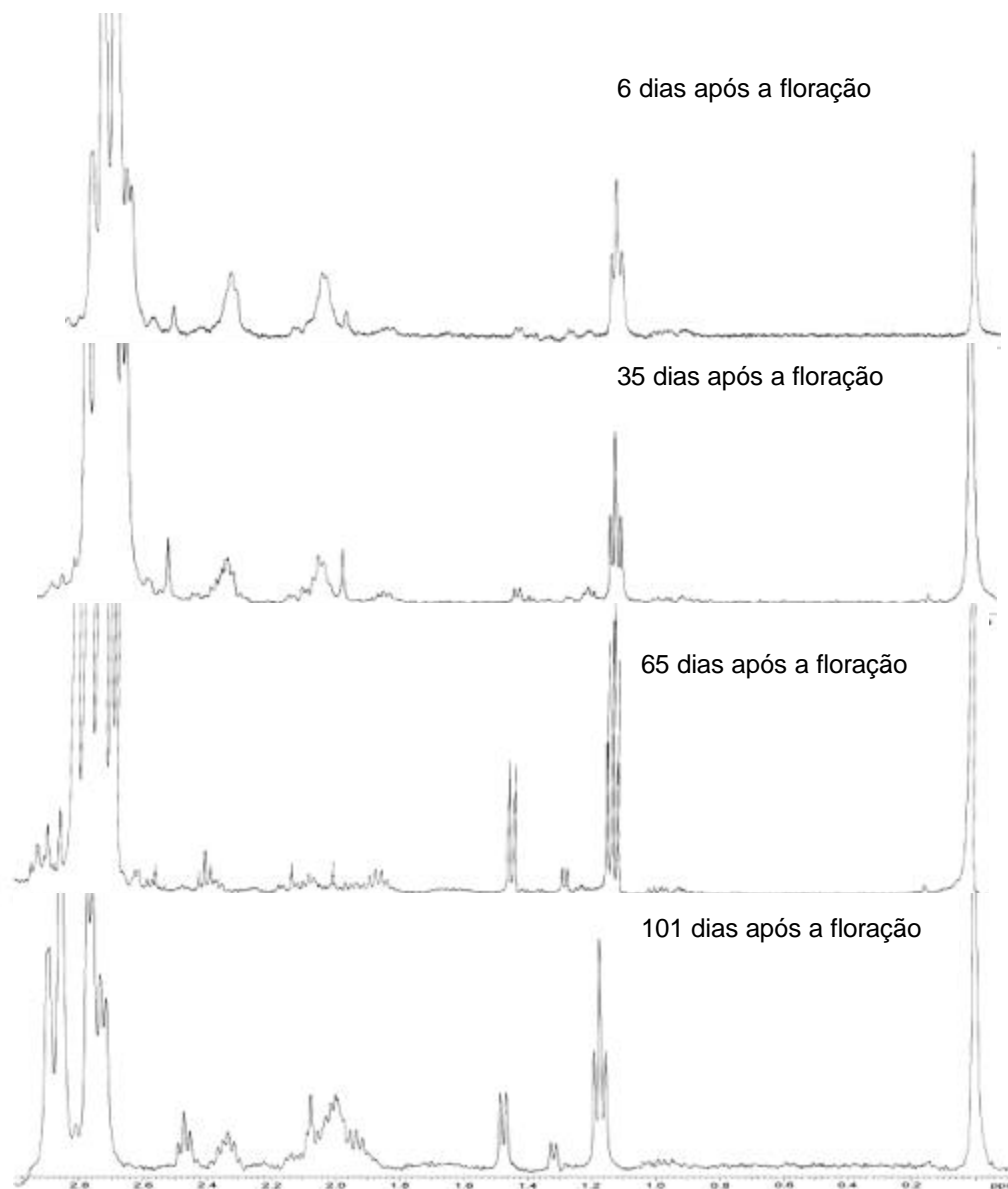


Figura 56: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da região de alto campo (0 – 3,0 ppm) da uva Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento (6, 35, 65, 101 dias após a floração).

O singlete em  $\delta = 0$  ppm é atribuído aos hidrogênios do TMSP, usado como padrão interno e como referência 0 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{D}_2\text{O}$ . O tripleto em  $\delta = 1,17$  ppm é atribuído aos hidrogênios  $\text{CH}_3$  do etanol ou de ésteres derivados do referido álcool. O dubleto em  $\delta = 1,49$  é atribuído ao grupamento  $\text{CH}_3$  da alanina. O

singleto em  $\delta = 2,08$  ppm é atribuído ao  $\text{CH}_3$  do íon acetato ou ésteres derivados desse ácido e os duplos dubletos em 2,83 e 2,91 aos grupamentos  $\text{CH}_2$  do ácido málico. Os demais sinais presentes nessa região não foram identificados. Esses deslocamentos químicos são referentes ao espectro obtido da uva coletada 65 dias após a floração e, devido à dependência dos sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com o pH das amostras, alguns deslocamentos químicos podem apresentar variações de amostra para amostra.

Na região de médio campo do espectro, que se estende de 3,0 – 5,5ppm, as ressonâncias são na sua maioria devido aos dois principais sacarídeos, D-glicose e D-frutose, encontrados nas amostras de uva. Outros sinais são provenientes de aminoácidos, ácidos e etanol. Os dubletos em  $\delta = 5,24$  ppm e  $\delta = 4,65$  ppm são atribuídos aos hidrogênios anoméricos da molécula de D-glicose, respectivamente o H-1 da  $\alpha$ -glicose e o H-1 da  $\beta$ -glicose. O tripleto em  $\delta = 3,25$  é atribuído ao H-2 da  $\beta$ -glicose. O dubleto em  $\delta = 4,10$  é o único sinal claramente identificado da molécula de frutose e refere-se ao H-2 da  $\alpha$ -D-frutofuranose. Os sinais na região entre 3,38ppm a 3,89ppm são principalmente devido à sobreposição de ressonâncias dos hidrogênios dos anéis das moléculas de glicose e frutose. Os deslocamentos químicos relatados nessa região são extraídos do espectro da uva coletada 101 dias após a data de floração.

Normalmente o dissacarídeo sacarose não é encontrado nas bagas das uvas. Esse é o principal açúcar translocado das folhas para o fruto em videiras. Sugere-se que a sacarose quando chega ao fruto é hidrolisada em glicose e frutose por enzimas invertases e dessa forma, esse dois monossacarídeos são armazenados nos vacúolos das uvas.

A Figura 57 apresenta o espectro de RMN 2D COSY (H-H) onde é possível observar as correlações entre os hidrogênios dos açúcares analisados e identificados por RMN de  $^1\text{H}$ .

Para a  $\alpha$ -glicose são observadas as correlações entre o hidrogênio H2 da metoxila (dd 3,53 ppm) e o H1 do hidrogênio anomérico (d 5,23 ppm). Para a  $\beta$ -glicose são observadas as correlações entre o hidrogênio H2 da metoxila (dd 3,24 ppm) e o H1 do hidrogênio anomérico (d 4,64 ppm). Para a frutose observa-se um fraco sinal para o

acoplamento entre o H3 da metoxila do anel frutofuranose (d 4,11 ppm) e o H4 da metoxila em 3,99 ppm do mesmo anel.

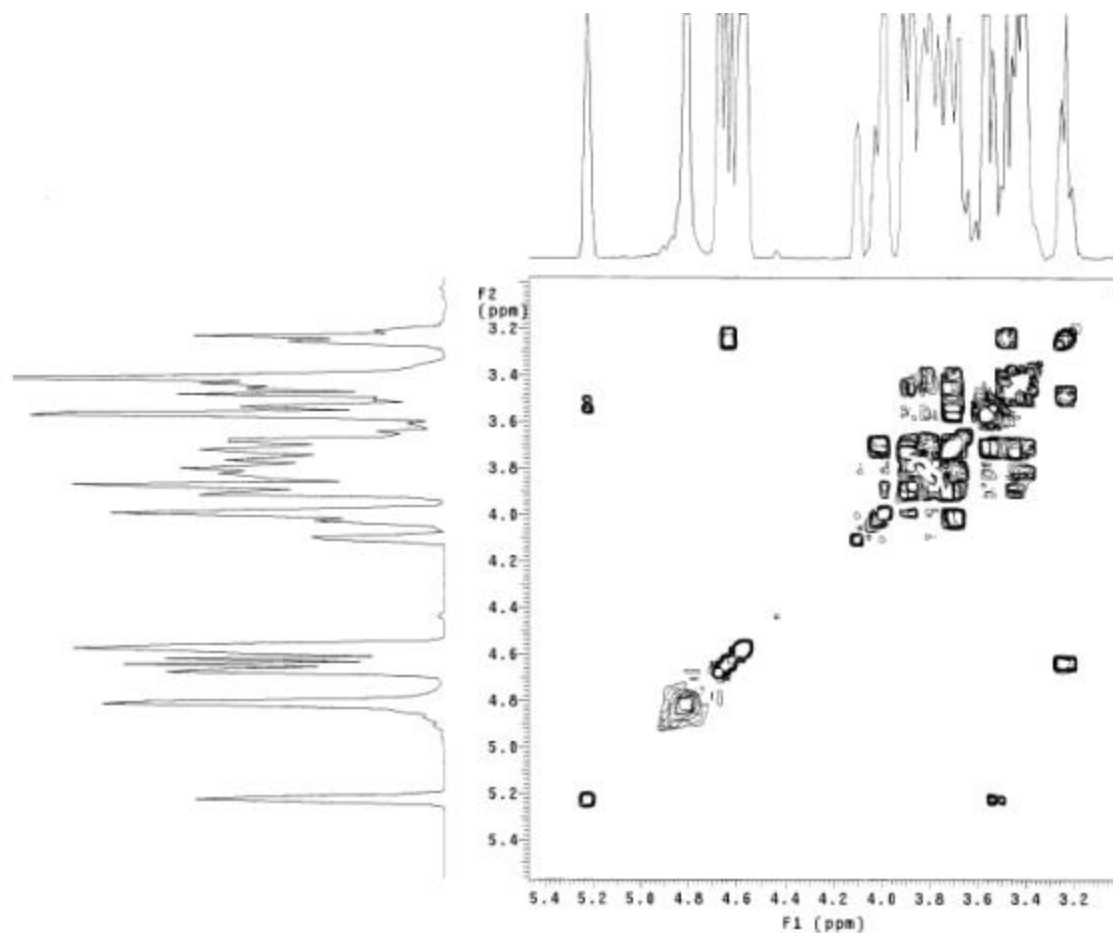


Figura 57: Espectro de RMN 2D COSY (H-H) com supressão parcial do sinal da água, para a uva Chardonnay coletada 62 dias após a floração.

Na região de baixo campo dos espectros (5,5ppm a 8,0ppm), os sinais observados são de baixa intensidade na uva coletada 06 dias após a floração. Nos demais estágios de desenvolvimento da fruta não são observados sinais nessa região, nas condições em que foram realizados os experimentos (Figura 55). Os sinais presentes nessa região são provenientes de hidrogênios aromáticos de aminoácidos e de compostos fenólicos. A atribuição de sinais nessa região é extremamente difícil devido à baixa intensidade dos mesmos, o que causa uma baixa relação sinal/ruído.

Espectrômetros de RMN com campos superiores ao utilizado nesse trabalho (9,4 T), seriam necessário nessas condições de concentração.

Na Figura 58 estão representados os espectros de  $^{13}\text{C}$  das amostras de uvas Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento.

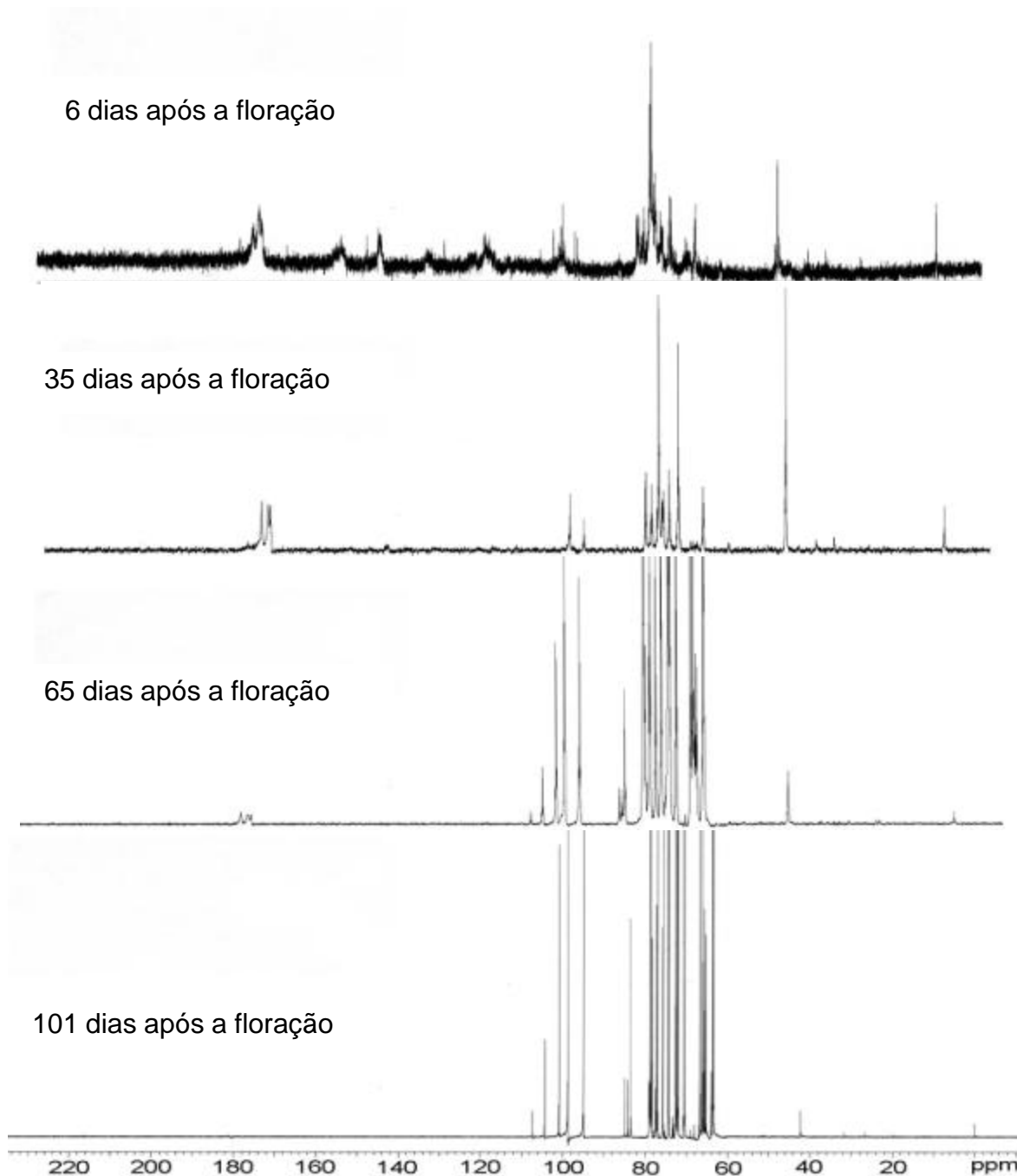


Figura 58: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das uvas Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento (6, 35, 65, 101 dias após a floração).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentados não podem ser usados como ferramenta quantitativa, pois foram obtidos em condições experimentais que não levaram em conta o tempo de relaxação dos carbonos analisados. Os tempos de espera entre pulsos utilizados foram de 1 segundo e durante todo o experimento o desacoplador permaneceu ligado.

Qualitativamente observa-se que o espectro da primeira colheita é dominado pelos sinais em 42 ppm e 75,6 ppm referentes aos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$  dos ácidos málico e tartárico respectivamente. Através dos espectros expandidos (Figura 59) nota-se que a proporção entre esses dois sinais varia de acordo com data de desenvolvimento e que o sinal do ácido málico diminui consideravelmente nas duas últimas datas de coleta. É ainda observada pouca variação na intensidade do sinal do ácido tartárico, confirmando a maior estabilidade deste ácido frente aos processos de catabolismo.

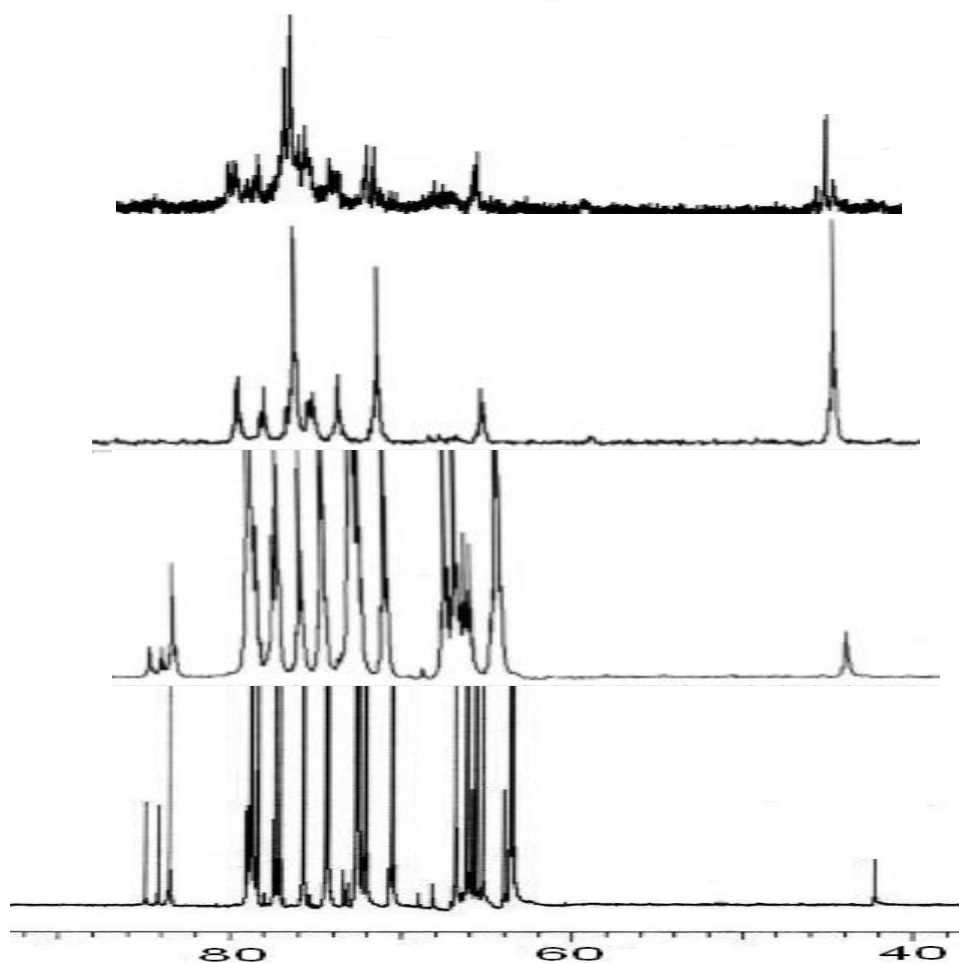


Figura 59: Expansão da região de 40 ppm a 90 ppm da Figura 58.



Os sinais observados entre 160 ppm e 180 ppm na Figura 58 são atribuídos às carbonilas dos ácidos málico (177,56 ppm e 175,26 ppm com acoplamento em 71,5 ppm e correlação com sinal 2,9 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  RMN; e 177,56 ppm e 175,26 ppm com acoplamento em 42 ppm e correlação em 4,5 ppm) e tartárico (179,9 com acoplamento em 75,8 e correlação em 4,7 ppm no espectro de  $^1\text{H}$ ) de acordo com as correlações e acoplamentos obtidas no espectro 2D HMBC (Figura 60).

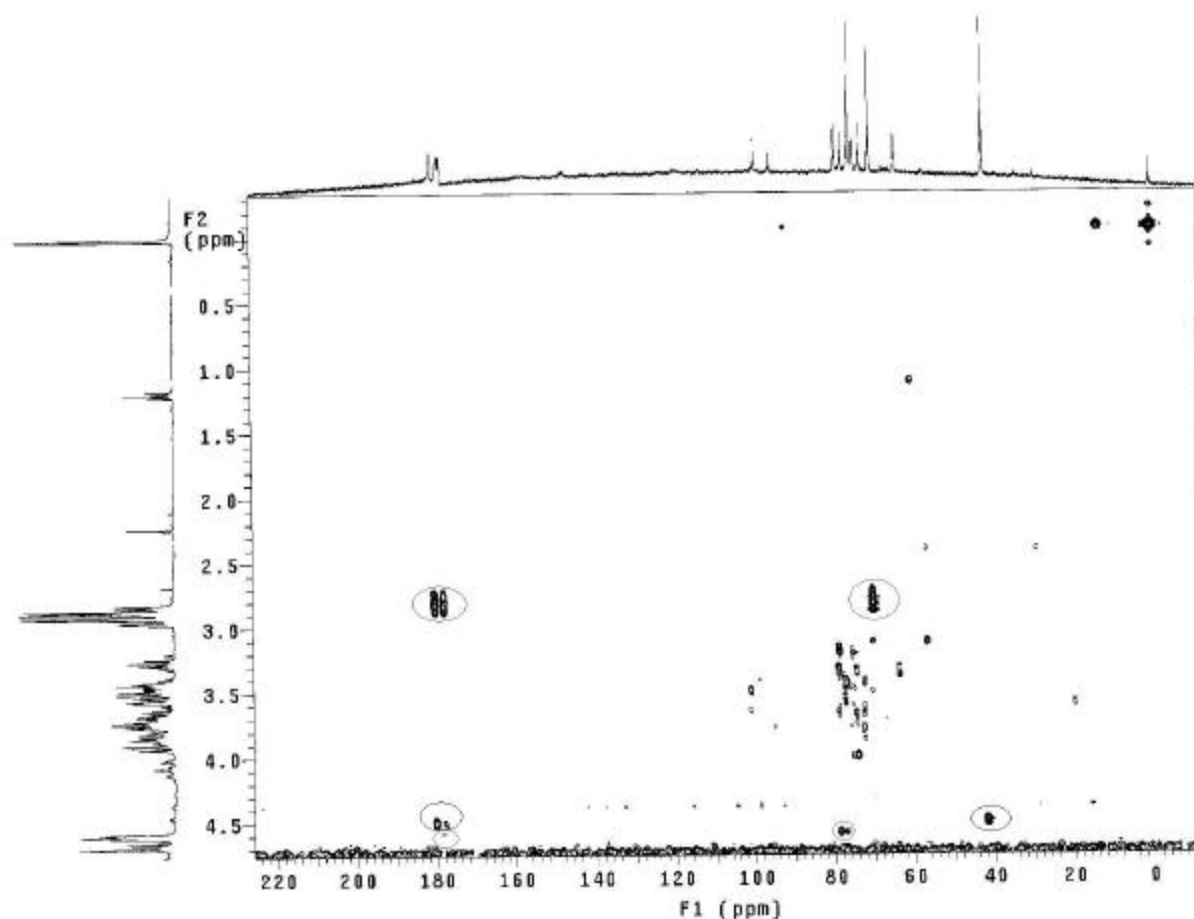


Figura 60: Espectro de 2D HMBC da uva Chardonnay 35 dias após a data de floração, utilizando valores de constante de acoplamento de até 8Hz (número de repetições 256 e número de incrementos de 128).

A vantagem dos experimentos de 2D HMBC quando comparados a experimentos de 2D HETECOR  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ , é de que através de experimentos de HMBC pode-se

analisar o espectro de  $^1\text{H}$ , e correlaciona este, ao espectro de  $^{13}\text{C}$ . Isto só é possível quando se trabalha com probes denominados de, “probes inversos”, onde a bobina de análise de núcleo de hidrogênio se encontra mais próxima da amostra. Desta forma os experimentos de HMBC são mais rápidos quando comparados aos experimentos de HETECOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , no qual a matriz é formada pelos FIDs de  $^{13}\text{C}$  e correlacionam com os espectros de  $^1\text{H}$ . Outra vantagem do 2D HMBC é que nesse tipo de experimento é possível analisar as correlações  $^{2-3}J_{\text{HC}}$ .

Analisando os espectros de  $^{13}\text{C}$  é possível observar o aparecimento dos sinais em 95,0 ppm, 98,6 ppm e 100,7 ppm referentes aos CH anoméricos da  $\alpha$ -glicose e  $\beta$ -glicose e C quaternário (H2) do anel piranose respectivamente<sup>44,45</sup>. A identificação desses carbonos foi confirmada através do espectro de DEPT (Figura 61) da uva Chardonnay 65 dias após a floração, no qual foi possível distinguir a presença de  $\text{CH}_2$  (na fase negativa do espectro), CH e  $\text{CH}_3$  (na fase positiva do espectro) e o desaparecimento dos carbonos quaternários.

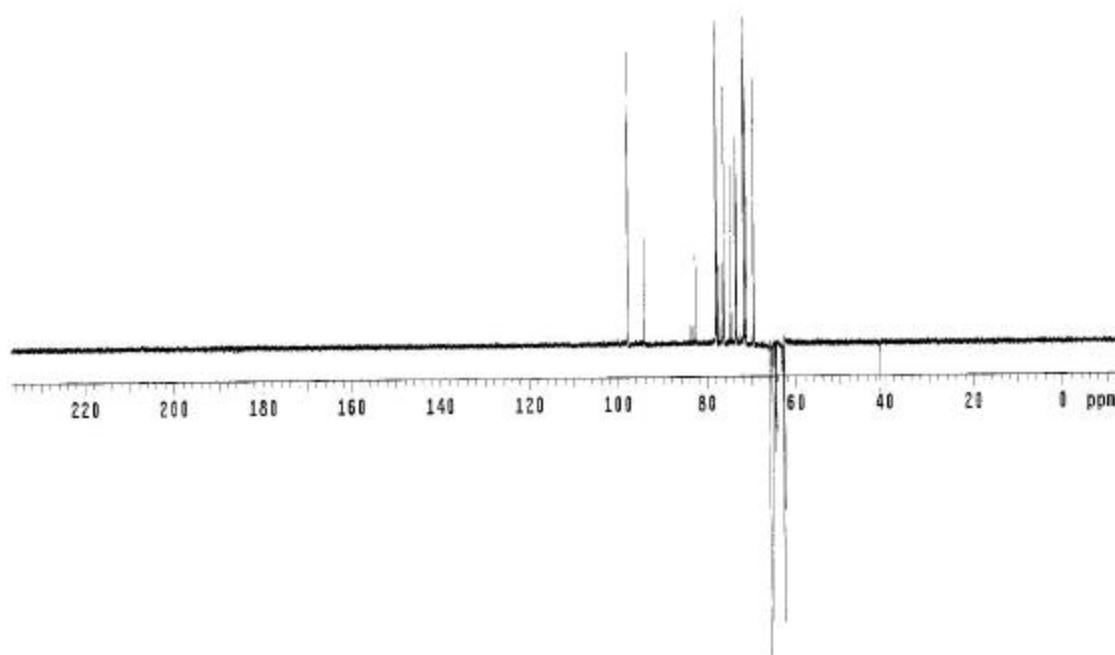


Figura 61: Espectro de DEPT da uva Chardonnay 65 dias após a floração.

Devido a baixa intensidade dos sinais referentes a alanina (dubleto 1,49 ppm no espectros de  $^1\text{H}$  com correlação em 18,43 ppm no espectro de  $^{13}\text{C}$ ), e prolina (multiplete 2,35 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  com correlação em 32,26 ppm no espectro de  $^{13}\text{C}$ ) nas amostras de uva, essas substâncias foram identificadas através dos dados da literatura<sup>10</sup> e pela adição de padrão interno às amostras de suco de uva, confirmando a presença de ambos os compostos.

Com base nas identificações feitas, á-glicose, â-glicose, frutose, ácido málico, etanol, alanina e prolina foram determinadas quantitativamente ( $\text{gL}^{-1}$ ) em cada estágio de desenvolvimento. Foram realizadas análises em triplicatas, utilizando diferentes cachos a fim de determinar o desvio padrão das medidas e identificar as variações químicas, que podem ser observadas para uma mesma uva em um mesmo vinhedo.

Para a quantificação foram analisados os sinais 2,34 ppm (multiplete) para a DL-prolina; 1,49 ppm (dubleto) para a DL-alanina; 2,64 ppm (duplo dubleto) e 2,83 ppm (duplo dubleto) para o ácido málico; 3,24 ppm (duplo dubleto) para a â-glicose; 4,11 ppm (dubleto) para a frutose; 5,23 (dubleto) para a á-glicose. Foram utilizados dois critérios para a seleção de sinais: (1) o mínimo de sobreposição com outras linhas do espectro e (2) a menor multiplicidade dos sinais devido aos acoplamentos spin-spin, de modo a obter uma melhor relação sinal/ruído.

As análises quantitativas foram conduzidas através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com pressaturação do sinal da água. Foram determinados os tempos de relaxação,  $T_1$  (Tabela 02), para cada hidrogênio a ser analisado de modo a determinar o tempo de espera entre os pulsos (delay time).

A fim de obter o máximo de recobrimento dos sinais  $> 99\%$ , e um tempo menor de análise foram utilizados pulsos com ângulo de  $45^\circ$  e tempo de espera entre pulsos de 12 segundos<sup>21</sup>.

Para a quantificação por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  é necessário levar em consideração a razão da área do sinal que se está analisando, referente às diferentes substâncias, com a área do sinal de um padrão interno de interesse. Nesse caso, o TMSP foi escolhido como padrão interno, pois é uma substância que se apresenta estável na matriz em análise, não interage com os compostos de interesse e não apresenta sobreposição com sinais da matriz<sup>102,103</sup>.

A concentração de cada substância ( $C_s$ ) foi calculada através da relação entre a integral da área obtida do sinal da substância ( $I_s$ ) relativa ao número de hidrogênios ( $n_s$ ), a integral da área do sinal do padrão interno TMSP ( $I_{TMSP}$ ) relativa ao número de hidrogênios do padrão ( $n_{TMSP}$ ) em uma concentração conhecida ( $C_{TMSP}$ ) e 1,25 que representa o fator de multiplicação da diluição do suco de uva (400 ÷ L) com (100 ÷ L) de  $D_2O$ , como descrito na equação 8:

$$C_s \text{ (gL}^{-1}\text{)} = \left\{ \frac{I_s/n_s}{I_{TMSP}/n_{TMSP}} \times C_{TMSP} \right\} \times 1,25$$

Equação 8

Na Tabela 16 são apresentados os valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) encontrados para cada substância e o desvio padrão das medidas ( $n=3$ ).

Tabela16: Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas realizadas para a uva Chardonnay Paulsen 1103, em triplicata ( $n=3$ )

Substâncias	Concentração em $\text{gL}^{-1}$ (desvio padrão)			
	6 dias <sup>A</sup>	35 dias <sup>A</sup>	65 dias <sup>A</sup>	101 dias <sup>A</sup>
â-glicose	4,72 (3,00)	2,07 (1,41)	29,9 (2,80)	74,4 (14,7)
frutose	n.d. <sup>B</sup>	n.d. <sup>B</sup>	30,13 (0,935)	99,2 (18,9)
â-glicose	2,00 (0,931)	4,55 (1,076)	55,25 (1,22)	126 (20,6)
ácido málico	8,20 (0,249)	17,1 (1,05)	39,8 (5,54)	9,77 (1,13)
prolina	n.d. <sup>B</sup>	n.d. <sup>B</sup>	n.d. <sup>B</sup>	0,872 (0,427)
alanina	n.d. <sup>B</sup>	0,0218 (0,0175)	0,324 (0,0335)	0,492 (0,154)

A) Dias após a floração

B) N.d. : não determinado

De maneira geral todas as substâncias quantificadas apresentaram valores de concentração próximos ao esperado para uvas *Vitis viníferas*<sup>90,92,95,104</sup>.

As variações quantitativas observadas para o aminoácido alanina sugerem que sua concentração aumenta com a maturação da uva. O mesmo tipo de comportamento já foi descrito para a manga, por Duarte e colaboradores<sup>6</sup>, onde estes acreditam que a concentração de alanina possa ser usada para monitorar o amadurecimento da manga. Nesse mesmo estudo foi observado uma diminuição da concentração de alanina na fase de pós maturação da manga.

O aminoácido prolina é detectado e quantificado apenas no ultimo estágio de maturação da uva. Foi relatado em trabalhos descritos na literatura<sup>105,106</sup> que o aumento da concentração de prolina é observado paralelamente ao aumento da quantidade de sólidos solúveis totais nas uvas. A concentração de prolina está normalmente associada a níveis de estresse hídrico sofrido pelas videiras<sup>107</sup>.

Em certas cultivares como a Chardonnay e a Cabernet sauvignon, a prolina pode representar de 80 a 90% do total de aminoácidos livres (na faixa de 0,5 – 0,8g/L). O conhecimento da composição dos aminoácidos na uva é de grande importância na elaboração do vinho, pois além de servirem como fonte de nitrogênio para as leveduras, podem também, sofrer uma série de biotransformações durante os processos fermentativos, gerando álcoois, aldeídos, ésteres e ácidos cetônicos. Dessa maneira podemos considerar que o perfil de aminoácidos está diretamente relacionado com as propriedades organolépticas do vinho<sup>108,109</sup>.

Analisando os resultados obtidos para as variações nas concentrações do ácido málico e dos açúcares, acredita-se que o início da fase de maturação, chamada de verção, para a uva Chardonnay cultivada em São Joaquim - SC (Quinta da Neve) no ano de 2003/2004, ocorreu próximo de 65 dias após a floração (22 de janeiro de 2004). Foi observado após essa data um decréscimo na concentração de ácido málico e um aumento de cerca de 3 vezes na concentração dos açúcares.

#### 4.3.5 Validação da metodologia.

A fim de avaliar a validade do método para a determinação dos compostos identificados nas amostras de uvas, foram realizados testes de recuperação. Para tanto foram feitas adições de cada substância na amostra de uva Chardonnay no estágio de desenvolvimento de 65 e 101 dias após a floração. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17: Concentrações e recuperações das diferentes substâncias medidas na amostra de suco de uva Chardonnay, 65 dias após a floração

	Concentração na amostra de uva 65 dias após a floração (gL <sup>-1</sup> )	Valores adicionados de cada substância (gL <sup>-1</sup> )	Fator de recuperação (R%)
â-glicose	26,86	27,01	103,4%
frutose	29,10	29,05	94,6%
â-glicose	56,46	56,10	96,2%
ácido málico	36,39	36,03	102,4%
prolina	n.d	-	-
alanina	0,3481	0,3502	98,7%

Tabela 18: Concentrações e recuperações das diferentes substâncias medidas na amostra de suco de uva Chardonnay, 101 dias após a floração

	Concentração na amostra de uva 101 dias após a floração(gL <sup>-1</sup> )	Valores adicionados de cada substância (gL <sup>-1</sup> )	Fator de recuperação (R%)
â-glicose	65,60	65,05	107,7%
frutose	81.12	80,03	92,1%
â-glicose	123,4	123,2	98,4%
ácido málico	9,515	10,00	107,1%
prolina	0,5702	0,6012	96,3%
alanina	0,3833	0,4002	101,6%

Os valores de recuperação variaram de 107% a 92% para as diferentes substâncias estudadas e estão de acordo com resultados obtidos em estudos quantitativos utilizando a RMN de <sup>1</sup>H<sup>80,81</sup>.

#### **4.4 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN (9,4 Tesla) durante o crescimento da uva Cabernet sauvignon sob porta-enxerto Palsen 1103 cultivada no município de São Joaquim**

A uva Cabernet sauvignon é originária da região de Bordeaux na França e está atualmente difundida na maior parte dos países vitivinícolas. Os vinhos elaborados a partir dessa uva apresentam alta valorização nos mercados nacional e internacional.

O estado de Santa Catarina produz atualmente cerca de 30 milhões de quilos de uvas, apenas 5% das uvas produzidas são da espécie *Vitis vinifera*, sendo entre elas a Cabernet sauvignon a uva que possui a maior área de plantio<sup>110</sup>.

Em 2003 a área plantada de Cabernet sauvignon na região de São Joaquim era de 100 hectares, com boas perspectivas de ampliação por parte de outros vitivinicultores. A região de São Joaquim oferece boas condições para o cultivo de uvas Cabernet Sauvignon como, por exemplo, altitude de 1.400 metros, inverno frio, boa adaptação com relação à brotação, e a grande vantagem de que a maturação dessas uvas acontece em abril quando o clima é seco, diminuindo a incidência de doenças. Outra vantagem é a variação de temperatura do dia e da noite, em torno de dez graus, o que melhora a maturação da uva propiciando vinhos de melhor qualidade, cor, aroma, corpo e estrutura<sup>110</sup>.

##### **4.4.1 Características físicas.**

A Cabernet Sauvignon é uma cultivar de brotação e de maturação tardia, relativamente vigorosa, com ramos novos de porte ereto e elevada qualidade para vinificação. As bagas da uva Cabernet sauvignon possuem cascas robustas resultando em uma fruta resistente, porém com folhas bastante frágeis.

A evolução do peso médio dos cachos, número de bagas por cacho, peso da ráquis, nos quatro diferentes estágios de desenvolvimento da uva Cabernet sauvignon cultivada em São Joaquim, estão apresentados na Tabela 19.



Tabela 19: Características físicas da uva Cabernet sauvignon cultivada sob o porta enxerto Paulsen 1103 no município de São Joaquim.

Estágio de desenvolvimento	Peso médio do cacho	Número médio de bagas por cacho	Peso médio da ráquis	Peso médio da baga
23 dias*	24,3604 ( $\pm 12,77$ )	184 ( $\pm 36$ )	4,3327 ( $\pm 0,71$ )	0,1425 ( $\pm 0,1139$ )
56 dias*	82,3304 ( $\pm 27,29$ )	193 ( $\pm 11$ )	5,6732 ( $\pm 1,13$ )	0,5102 ( $\pm 0,0986$ )
91 dias*	202,5155 ( $\pm 113,30$ )	185 ( $\pm 29$ )	7,7471 ( $\pm 3,19$ )	1,1723 ( $\pm 0,2618$ )
127 dias*	211,5935 ( $\pm 81,55$ )	160 ( $\pm 50$ )	8,5796 ( $\pm 2,22$ )	1,3203 ( $\pm 0,0943$ )

\* Dias após a floração

Observou-se grande aumento no peso da baga, cerca de 4 vezes, entre 23 e 56 dias após a floração, caracterizando a fase de crescimento da baga. Entre 56 e 91 dias após a floração, as bagas dobraram de volume, nessa fase as uvas estão provavelmente em início de estágio de maturação (Tabela 19). Pouca variação de peso foi observada entre 91 a 127 dias após a floração, caracterizando o estágio de maturação do fruto, quando normalmente, observa-se uma pequena variação de peso das bagas<sup>96</sup>. As bagas apresentaram ao final do ciclo de desenvolvimento um peso médio de 1,32g.

A Figura 62 apresenta os gráficos de distribuição do tamanho da baga (comprimento em mm) em função do número percentual de bagas, em medidas realizadas em 4 cachos.

Durante o ciclo de desenvolvimento da uva Cabernet sauvignon as uvas apresentaram uma uniformidade de tamanho na primeira e na última data de coleta (23 e 127 dias após a floração). Nas fases intermediárias as uvas tendem a uma perda da uniformidade de tamanho. Na época de colheita mais de 75% das bagas apresentaram tamanhos variando de 11,0 a 15,0 mm de comprimento, tamanho este condizente com o relatado na literatura para esta uva.

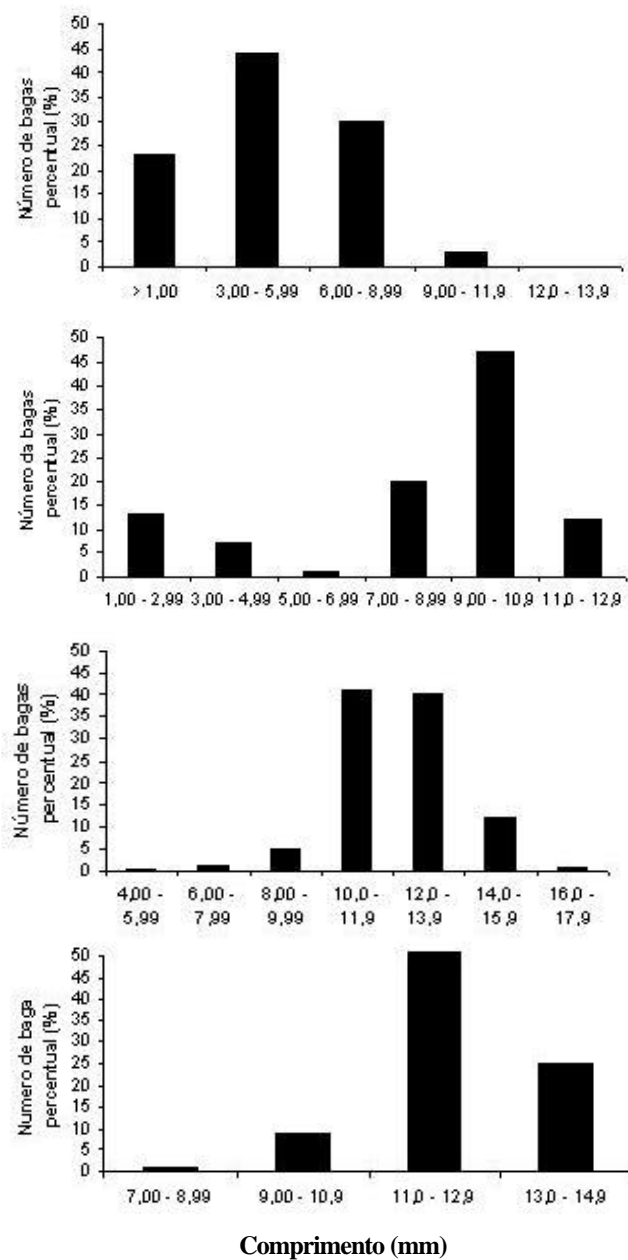


Figura 62: Distribuição do tamanho da baga (comprimento em mm) em função do número percentual de bagas, para uva Cabernet Sauvignon (Paulsen 1103), cultivada em São Joaquim.

Na época de colheita, a uva Cabernet sauvignon (porta-enxerto Paulsen 1103) apresentou cachos com peso médio de 211,6g formado por um número médio de 160 bagas/cacho. As uvas cultivadas em São Joaquim parecem apresentar um bom desenvolvimento físico.

As Figuras 63, 64 e 65 mostram os cachos da uva Cabernet sauvignon cultivada sobre o porta-enxerto Paulsen 1103 nas datas correspondentes a 56, 91 e 127 dias após a floração.



Figura 63: Cacho de uvas Cabernet sauvignon do vinhedo Quinta da Neve em São Joaquim no dia 22/01/2004 (56 dias após a floração).



Figura 64: Cacho de uvas Chabernet sauvignon do vinhedo Quinta da Neve em 26/02/2004 (91 dias após a floração).



Figura 65: Cacho de uvas Chabernet sauvignon do vinhedo Quinta da Neve em 02/04/2004 (127 dias após a floração).

Os cachos da uva Cabernet sauvignon foram caracterizados como grandes e compactos, não mostrando grande variação de tamanho entre 56 e 127 dias após a floração, como pode ser observado nas Figuras 63, 64 e 65.

As variações físicas observadas entre as uvas Cabernet sauvignon (Paulsen 1103) e a uva Chardonnay (Paulsen 1103) cultivadas no Vinhedo Quinta da neve podem ser atribuídas à diferença da variedade.

#### 4.4.2 Determinação de grau Brix.

A Figura 66 apresenta o gráfico de valores do °Brix médio em função da data de coleta.

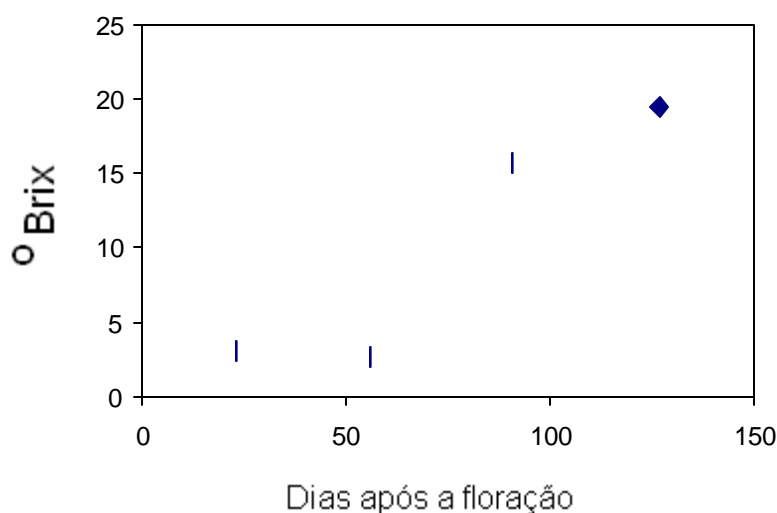


Figura 66: Valores de grau Brix médio em função da data de amostragem para a uva Cabernet sauvignon (Paulsen 1103), cultivada em São Joaquim.

As primeiras datas de coleta 23 e 56 dias após a floração parecem corresponder ao primeiro estágio de desenvolvimento do fruto, antes da veração, quando a uva se caracteriza por ser ainda verde e por apresentar um teor de açúcar baixo<sup>90</sup>. A partir desse período detectou-se um aumento do °Brix, o qual prolongou-se até a data de colheita da uva.

Acredita-se que os mesmos fatores responsáveis pela queda de °Brix observada para a uva Chardonnay estejam influenciando a uva Cabernet sauvignon, cuja queda do °Brix também é observada entre 23 e 56 dias após a floração.

#### 4.4.3 Determinação de pH e acidez titulável

Na Figura 67 e na Tabela 20 são apresentados os valores médios de pH e acidez titulável, respectivamente, observados durante o desenvolvimento da uva Cabernet sauvignon, cultivada em São Joaquim.

O pH da uva é de fundamental importância na elaboração do vinho, pois está diretamente relacionado com a sanidade do mosto e estabilidade da coloração do vinho. Uvas que apresentem valores elevados de pH podem gerar problemas de conservação do vinho<sup>93,111</sup>

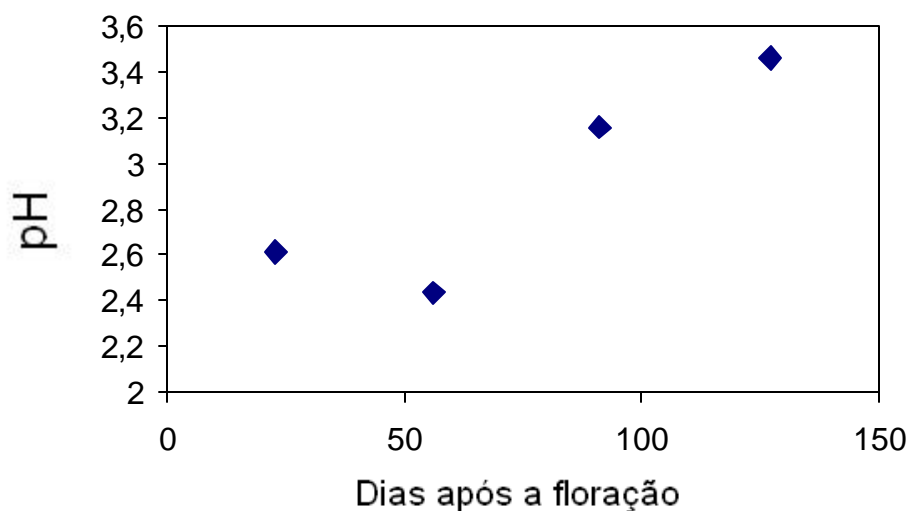


Figura 67: Valores de pH médio em função das datas de amostragem para a uva Cabernet sauvignon cultivada em São Joaquim.

O gráfico de pH do suco da uva em função da data de coleta, mostra uma queda do pH entre 23 e 56 dias após a floração, associada provavelmente, à síntese de ácidos orgânicos. Após este período ocorre um aumento do pH do suco. Na data de coleta (127 dias após a floração) a uva apresentou um pH médio de 3,46.

O valor de pH considerado ideal para o mosto de uvas destinadas à vinificação em tinto é de 3,3<sup>69,87</sup>. Valores mais elevados de pH pressupõem absorção elevada de potássio pela videira e, conseqüente, formação de sais derivados dos ácidos orgânicos,

especialmente o tartárico<sup>87</sup> ou diminuição da acidez málica em função dos processos respiratórios. Nem sempre esperar a uva atingir altas concentrações de açúcares pode ser uma prática aconselhável para a obtenção de vinhos de qualidade, pois deve-se sempre considerar a relação entre a quantidade de açúcar e acidez da uva<sup>111</sup>.

Tabela 20: Valores da acidez titulável durante os estágios de desenvolvimento da uva Cabernet sauvignon sobre o porta-enxerto Paulsen 1103 cultivada em São Joaquim.

Estágios de desenvolvimento	Acidez Titulável <sub>Fenolf.</sub> (g/100mL $\pm$ SD )	Acidez Titulável <sub>Potenc</sub> (g/100mL $\pm$ SD).
23 dias*	3,10 $\pm$ 0,01	3,02 $\pm$ 0,02
56 dias*	3,15 $\pm$ 0,04	3,11 $\pm$ 0,05
91 dias*	0,97 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,01
127 dias*	0,47 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02

\* Dias após a floração

Quanto aos valores de acidez titulável, observou-se um aumento dos mesmos entre 23 e 56 dias após a floração, acompanhando a mesma tendência do pH, visto que acidez titulável e o pH são valores inversamente proporcionais. Após esse período constatou-se uma diminuição dos valores de acidez os quais foram mais acentuados próximo do período de maturação.

Entre os fatores que determinam a redução do teor de acidez titulável, podemos destacar: a diluição dos ácidos orgânicos devido ao aumento do volume da baga, a mobilização dos ácidos e de minerais durante a maturação e o decréscimo da concentração do ácido málico devido aos processos respiratórios como descrito anteriormente<sup>90</sup>.

As variações de valores observadas para as duas análises, potenciométricas e com o uso do indicador, foram previamente discutidas no capítulo 4.3.3.

#### 4.4.4 Determinação qualitativa e quantitativa da composição química por ressonância magnética nuclear.

Neste capítulo são apresentados e discutidos os espectros de RMN de 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) obtidos em um espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla, das uvas Cabernet sauvignon cultivadas sob o porta-enxerto Palsen 1103, nas diferentes etapas de desenvolvimento da uva.

Na Figura 68 são apresentados os espectros (0 a 6ppm) de RMN de  $^1\text{H}$  dos sucos obtidos nas diferentes fases de crescimento das uvas Cabernet sauvignon cultivada sob o porta-enxerto Paulsen 1103, onde foi aplicada a técnica de supressão do sinal, para o sinal da água.

Os sinais que aparecem entre 0 ppm e 6 ppm, correspondem aos metabólitos da uva. Foi identificada a presença de: á-glicose (5,23 d), frutose (4,11ppm d), â-glicose (3,24ppm dd), ácido málico (2,64 ppm dd e 2,83 ppm dd), prolina (2,34 ppm m) alanina (1,49 ppm d) etanol/ésteres etílicos (1,17 ppm t), cujos sinais e deslocamento químico foram identificados e discutidos na capítulo 4.3.4.

Na Figura 69 estão representados os espectros de  $^{13}\text{C}$  das amostras de uvas Chardonnay nos diferentes estágios de desenvolvimento.

Com base nas identificações feitas, á-glicose, â-glicose, frutose, ácido málico, etanol, alanina e prolina, foram determinadas quantitativamente ( $\text{gL}^{-1}$ ) em cada estágio de desenvolvimento. Foram realizadas análises em triplicatas, utilizando diferentes cachos a fim de determinar o desvio padrão das medidas e correlacionar com as variações químicas, que podem ser observadas para uma mesma uva em um mesmo vinhedo. Os resultados quantitativos são apresentados na Tabela 21.



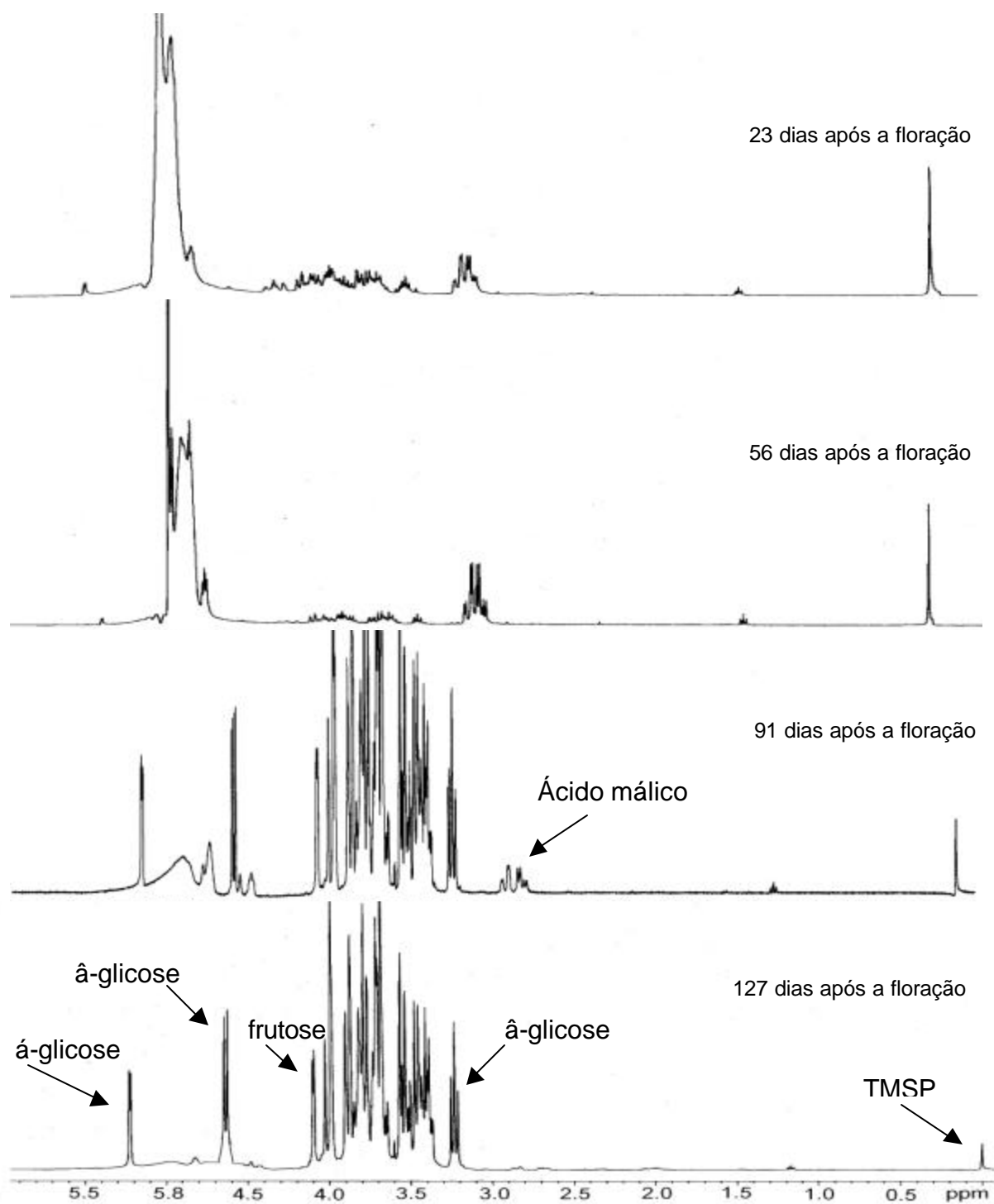


Figura 68: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) da uva Cabernet sauvignon nos diferentes estágios de desenvolvimento (23, 59, 91 e 127 dias após a floração).

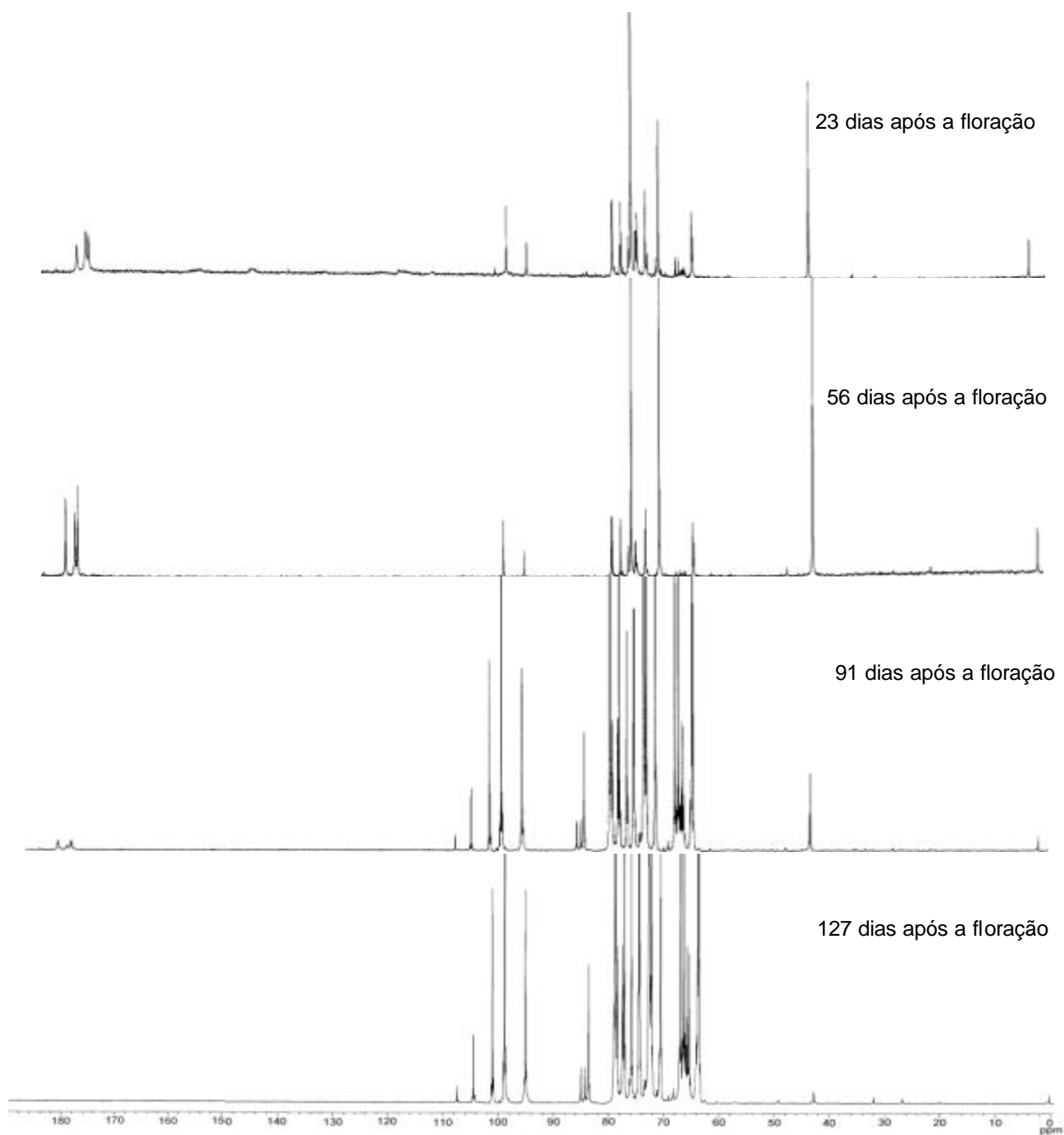


Figura 69: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (9,4 Tesla) da uva Cabernet sauvignon nos diferentes estágios de desenvolvimento (23, 59, 91 e 127 dias após a floração).

Tabela 21: Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas obtidas para a uva Cabernet sauvignon Paulsen 1103, cultivada em São Joaquim.

Substância	Concentração em $\text{gL}^{-1}$ (desvio padrão)			
	23 dias <sup>A</sup>	56 dias <sup>A</sup>	91 dias <sup>A</sup>	127 dias <sup>A</sup>
á-glicose	1,35 (0,251)	0,782 (0,434)	38,4 (12,0)	53,6 (2,75)
frutose	0,839 (0,365)	n.d. <sup>B</sup>	41,4 (1,13)	80,9 (2,79)
â-glicose	2,94 (0,214)	1,92 (0,451)	47,0 (5,93)	88,7 (3,49)
ácido málico	9,80 (0,469)	15,6 (1,73)	15,0 (2,51)	4,35 (0,142)
prolina	n.d. <sup>B</sup>	n.d. <sup>B</sup>	n.d. <sup>B</sup>	0,631 (0,00729)
alanina	n.d. <sup>B</sup>	0,0199 (0,0773)	0,642 (0,0545)	0,0640 (0,0214)

A) Dias após a floração

B) n.d. : Valor não determinado

As variações de composição química para a uva Cabernet sauvignon sob porta enxerto Paulsen 1103, cultivada em São Joaquim (Quinta da Neve), parecem acompanhar a mesma tendência observada para a uva Chardonnay, sob o mesmo porta enxerto cultivada na mesma propriedade. Na primeira fase de desenvolvimento observou-se uma queda na concentração de açúcares acompanhada por um aumento na concentração do ácido málico. O mesmo comportamento foi observado nas medidas de °Brix e pH.

O início de maturação da Cabernet sauvignon parece ocorrer entre 56 e 91 dias após a floração, quando nesta época é observado um pequeno decréscimo nas

quantidades de ácido málico e um aumento de cerca de 5 vezes nas concentrações dos açúcares<sup>90</sup>.

Para o aminoácido alanina nas primeiras fases de desenvolvimento observa-se um aumento da concentração com o desenvolvimento da fruta. No entanto, uma queda considerável de concentração é observada entre 91 e 127 dias após a floração. Não há na literatura nenhum trabalho que descreva quedas tão acentuadas na concentração de alanina na última fase de desenvolvimento da uva, porém analisando trabalhos publicados para a manga<sup>6</sup>, essa queda de concentração observada para a uva Cabernet sauvignon cultivada em São Joaquim, pode, talvez, ser associada a uma sobrematuração da fruta. A prolina é novamente detectada apenas na última fase de desenvolvimento, sendo sua concentração final de  $0,631\text{gL}^{-1}$ .

Comparando os desvios padrões das medidas, observa-se um menor desvio para as quantificações realizadas para a uva Cabernet sauvignon em relação a uva Chardonnay. Acredita-se que os altos valores de desvio padrão observados para a uva Chardonnay possam estar associados a problemas de geadas sofridas durante a fase de floração. O mesmo problema não ocorreu durante a floração da uva Cabernet sauvignon. As uvas Cabernet sauvignon e Chardonnay são variedades distintas, o que também pode causar variações bioquímicas durante o desenvolvimento. Cabe ressaltar que essas uvas foram cultivadas na mesma região e sob o mesmo porta-enxerto eliminando desta forma, variações decorrentes de tipo de solo e de absorção diferenciada de nutrientes do solo em função da raiz.

#### **4.5 Acompanhamento das características físicas, das propriedades físico-químicas e da composição química por RMN (9,4 Tesla), durante o desenvolvimento da uva Cabernet sauvignon sob os porta-enxertos VR 043-43 e Palsen 1103, cultivada no município de Videira.**

A viticultura brasileira ocupa uma área superior 63.800 hectares, desse total, 2.233 hectares estão no Estado de Santa Catarina. Em Santa Catarina, a vitivinicultura apresenta expressão econômica principalmente na Região do Vale do Rio do Peixe, situada a 27° de latitude sul, 51° de longitude oeste e a uma altitude 600-800m acima do nível do mar. Essa região apresenta como indicadores climáticos médios: precipitação de 1800mm/ano, temperatura 17,1°C e umidade relativa do ar de 80%.

Observou-se, ao longo dos últimos anos uma substituição das castas americanas por castas européias, com destaque para a variedade francesa Cabernet Sauvignon. Na década de 90, ocorreu em Santa Catarina uma queda considerável na produtividade dos vinhedos e uma forte redução da área plantada de uva, devido a viroses e morte de plantas causadas pela fusariose (*Fusarium oxysporum* Sch. f.sp. *herbemontis*) e margarodes (*Eurhizococcus brasiliensis*). Uma alternativa para a recuperação dos vinhedos foi o desenvolvimento de porta enxertos resistentes a essas doenças<sup>110</sup>.

Nesta parte do trabalho será apresentada e discutida a avaliação dos parâmetros físicos (peso do cacho, número de bagas, peso da ráquis, tamanho e peso das bagas), físico-químicos (pH, °Brix e acidez total) e da composição química determinada por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, durante o desenvolvimento de uvas Cabernet Sauvignon cultivadas na região de Videira em Santa Catarina, na localidade de Santa Lúcia, sobre os porta enxertos Paulsen 1103 e VR043-43.

##### **4.5.1 Características Físicas**

A evolução das características físicas durante o crescimento da uva Cabernet Sauvignon cultivada sob os porta enxerto VR 043-43 e Palsen 1103 estão descritas nas Tabelas 22 e 23, respectivamente.

Tabela 22: Características físicas da uva Cabernat sauvignon cultivada sob o porta enxerto VR 043-43, no município de Videira.

Estágios de desenvolvimento	Peso médio do cacho	Número médio de bagas por cacho	Peso médio da ráquis	Peso médio da baga
53 dias*	142,5463g ( $\pm 20,64$ )	197 ( $\pm 78$ )	10,9953( $\pm 3,36$ )	0,7817 ( $\pm 0,0645$ )
83 dias*	283,9457 ( $\pm 73,73$ )	179 ( $\pm 47$ )	12,8570 ( $\pm 3,36$ )	1,5103( $\pm 0,1249$ )
118 dias*	300,2424 ( $\pm 110,18$ )	171 ( $\pm 60$ )	9,9787 ( $\pm 3,62$ )	1,6877 ( $\pm 0,0346$ )

\* Dias após a floração

Tabela 23: Características físicas da uva Cabernet sauvignon cultivada sob o porta enxerto Palsen 1103, no município de Videira.

Estágios de desenvolvimento	Peso médio do cacho	Número médio de bagas por cacho	Peso médio da ráquis	Peso médio da baga
53 dias*	135,0491g ( $\pm 28,94$ )	167 ( $\pm 43$ )	6,8864( $\pm 2,61$ )	0,7438 ( $\pm 0,0498$ )
83 dias*	226,0005 ( $\pm 37,34$ )	156 ( $\pm 34$ )	10,9988 ( $\pm 2,87$ )	1,3790( $\pm 0,1111$ )
118 dias*	263,0776 ( $\pm 50,09$ )	146 ( $\pm 36$ )	12,0168 ( $\pm 1,46$ )	1,7239 ( $\pm 0,0535$ )

\* Dias após a floração

Observou-se um maior incremento no peso da baga entre o período de 22/12 até 21/01, correspondente a 53 e 83 dias após a floração e um menor incremento no período que se estendeu até a data da colheita, em 25/02/04, 118 dias após a floração. Nessa fase, o peso da baga da Cabernet Sauvignon cultivadas sob os dois porta enxertos foi inferior a 2,0g sendo esse peso, característico de bagas de pequeno tamanho, como esperado para a cultivar Cabernet sauvignon<sup>87</sup>.

Na Figura 70 são apresentados os gráficos de distribuição do tamanho da baga (comprimento em mm) em função do número percentual de bagas, em medidas realizadas em 3 cachos. Os gráficos de comprimento da baga em função do número

percentual apresentaram uma distribuição monomodal, isto é, sempre apresentando um ponto máximo.

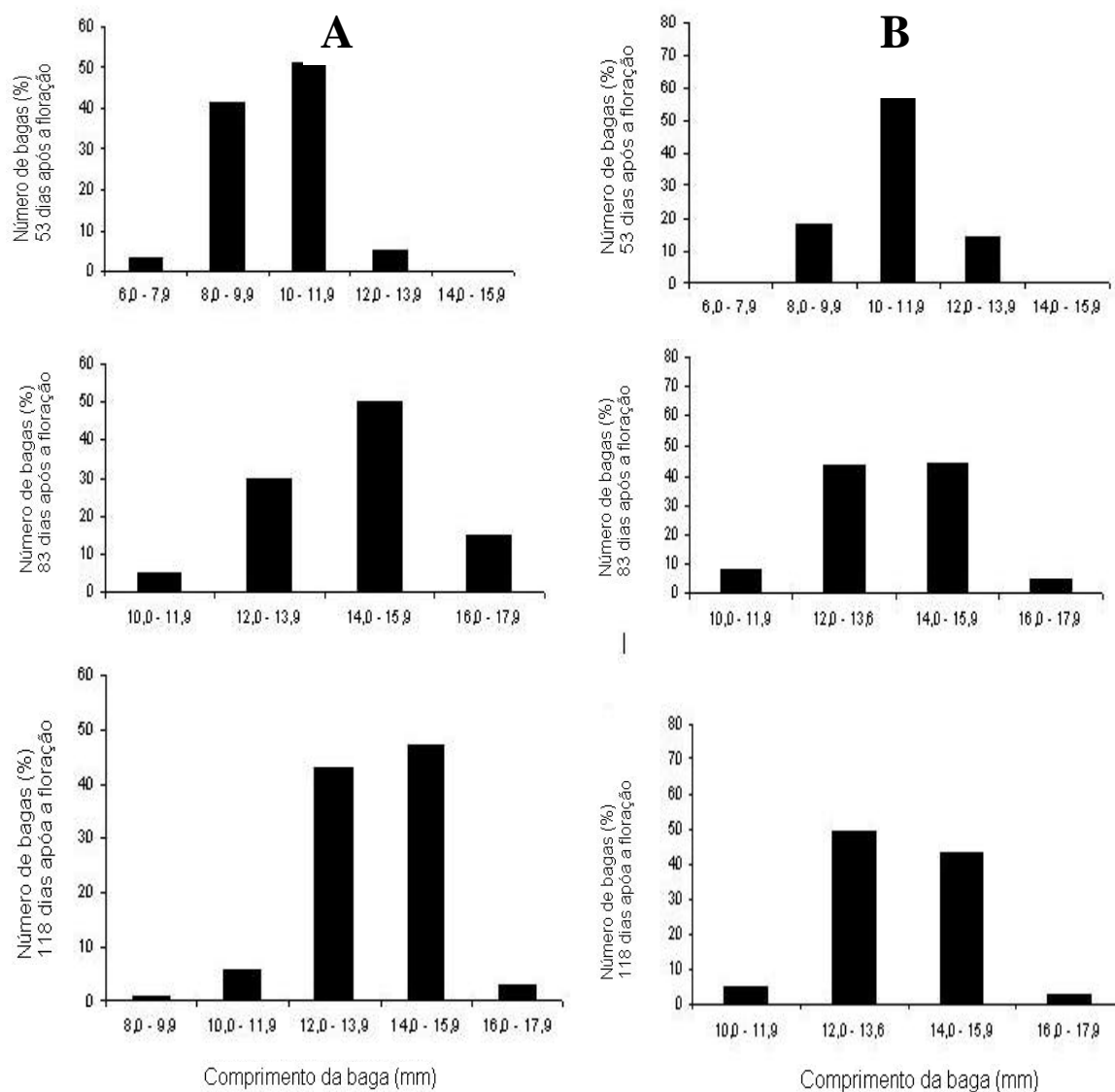


Figura 70: Gráfico de distribuição do comprimento da baga (mm) em função do número percentual de bagas da uva Cabernet Sauvignon sob porta enxerto VR 043-43 (A) e sob o porta enxerto Paulsen 1103 (B), nas diferentes datas de coleta.

As bagas da uva Cabernet Sauvignon cultivada sobre o porta-enxerto VR 043-43 (Figura 70 A) apresentaram uma considerável variação de tamanho entre os estágios de desenvolvimento de 83 e 118 dias após a floração. Na colheita das uvas para vinificação (118 dias após a floração), 90 % das bagas medidas apresentaram um comprimento na faixa de 12,00 mm a 15,90 mm de comprimento.

A uva Cabernet Sauvignon cultivada sobre o porta enxerto Paulsen 1103 (Figuras 70B) pareceu apresentar um crescimento mais uniforme, quando observou-se uma pequena variação do crescimento entre os estágios de desenvolvimento 83 e 118. No dia da colheita das uvas destinadas à vinificação (118 dias após a floração), 92% das bagas estavam na faixa de 12,00 mm a 15,99mm de comprimento.

No acompanhamento do peso do cacho, observou-se maiores valores e maior desvio padrão nas medidas efetuadas para a uva Cabernet Sauvignon, cultivada sob o porta-enxerto VR 043-43. Parece que esse porta enxerto conduz a um maior vigor das plantas e à produção de cachos de tamanhos irregulares.

Nas Figuras 71 e 72 são mostrados os cachos da uva Cabernet sauvignon cultivada sobre o porta enxerto VR 043-43, nos estágios de desenvolvimento de 83 e 118 dias após a floração.



Figura 71: Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto VR 043-43 cultivada no vinhedo da Empresa Videcar em Videira, 83 dias após floração.





Figura 72: Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto VR 043-43 cultivada no vinhedo da Empresa Videcar em Videira, 118 dias após floração.

As uvas Cabernet Sauvignon cultivadas sobre o porta-enxerto Paulsen 1103, parecem apresentar cachos uniformes com pequenas variações de peso e tamanho. As Figuras 73 e 74 mostram essa uva no estágio de desenvolvimento 83 e 118 dias após a floração.



Figura 73: Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto Paulsen 1103 cultivada no vinhedo da Empresa Videcar em Videira, 83 dias após floração.



Figura 74: Cacho da uva Cabernet sauvignon com enxerto Paulsen 1103 cultivada no vinhedo da Empresa Videcar em Videira, 118 dias após floração.

Os resultados demonstram que as uvas cultivadas sobre o porta-enxerto VR 043-43 apresentaram cachos de tamanhos e bagas com maior comprimento.

Acredita-se que o rendimento da cultivar Cabernet sauvignon não deve ser superior a  $1\text{Kg/m}^2$ . Em caso de rendimento muito maior, o vinho produzido pode apresentar fortes odores de “pimentão verde” e “pouco corpo”<sup>112</sup>. A fim de aumentar o rendimento sem comprometer a qualidade deve-se efetuar a coleta no estado de maturação ótimo onde a baga de uva atinge o máximo do seu peso.

#### 4.5.2 Determinação de Grau Brix

Na Figura 75 são apresentadas as variações de valor médio de grau Brix durante o desenvolvimento das uvas Cabernet sauvignon, cultivadas sob os porta enxertos estudados. O parâmetro avaliado apresentou valores próximos nos primeiros estágios de desenvolvimento e uma maior diferença de valor médio de grau Brix foi observada em 118 dias após a floração para as uvas cultivadas sob os diferentes porta enxertos.

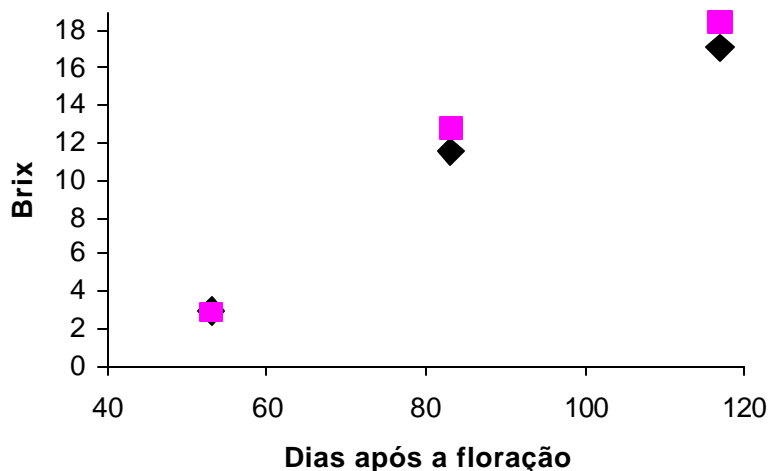


Figura 75: Gráfico do valor do grau Brix médio em função da data de coleta para a uva Cabernet Sauvignon cultivada sob os porta enxertos VR 043-43 (♦) e Paulsen 1103 (■).

Normalmente observa-se um aumento do grau Brix com o crescimento da uva, devido ao aumento dos teores de glicose e frutose. Alguns autores acreditam que a uva chega ao seu estágio ótimo de colheita para a elaboração de vinhos quando o fruto alcança valores máximos de grau Brix<sup>113</sup>. Outros autores acreditam que, esperar a uva atingir uma alta concentração de açúcar para colhê-la, nem sempre contribui para melhorar a qualidade do vinho e que uvas cultivadas em regiões frias, com maturação intermediária produzem muitas vezes, vinho de ótima qualidade<sup>89</sup>.

#### 4.5.3 Determinação de pH e Acidez Titulável

A Figura 76 e a Tabela 24 apresentam as variações de pH e acidez titulável, respectivamente, observadas durante o desenvolvimento da uva Cabernet sauvignon, cultivada em Videira sob os porta-enxertos Paulsen 1103 e VR 043-43.

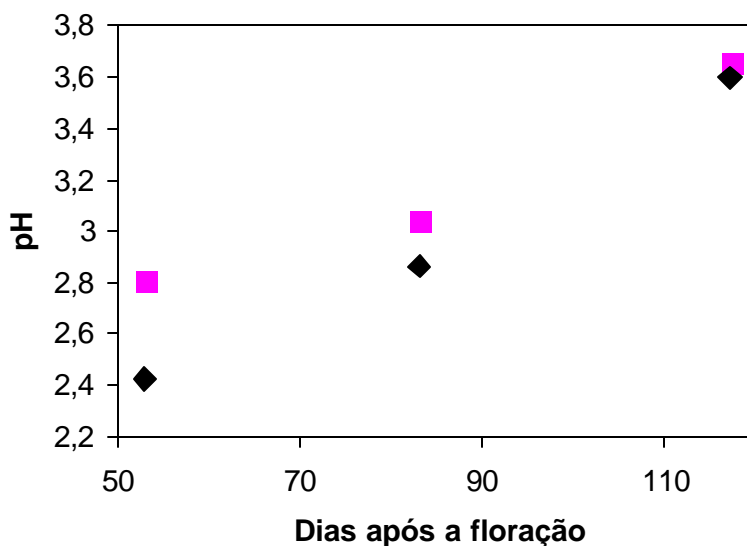


Figura 76: Valores de pH médio em função da data de coleta para a uva Cabernet sauvignon cultivada sob os porta enxertos VR 043-43 (◆) e Paulsen 1103 (■).

Observou-se um aumento do pH com o desenvolvimento do fruto, devido provavelmente, à diminuição nas concentrações de ácido tartárico e do ácido málico. Para a uva Cabernet sauvignon cultivada sob os porta enxertos VR 043-43 e Paulsen 1103, constatou-se valores distintos de grau Brix e pH nas diferentes fases de desenvolvimento. Tal fato pode indicar que uvas de uma mesma família e espécie sob porta enxertos diferentes podem apresentar teores de açúcares e ácidos orgânicos variáveis.

Com relação à qualidade do vinho a ser elaborado, tanto a uva Cabernet sauvignon cultivada sob o porta enxerto VR 043-43 quanto a uva cultivada sobre o

porta-enxerto Paulsen 1103 apresentaram altos valores de pH (3,6 e 3,7 respectivamente) na época da colheita (118 após a floração).

Tabela 24: Valores de acidez titulável durante o desenvolvimento da uva Cabernet sauvignon sobre os porta-enxertos VR 043-43 e Paulsen 1103.

Pota-enxerto	Estágios de desenvolvimento <sup>B</sup>	Acidez Titulável <sub>Fenolf.</sub> (g/100mL $\pm$ SD <sup>C</sup> )	Acidez Titulável <sub>Potenc</sub> (g/100mL $\pm$ SD <sup>C</sup> )
Pulsen 1103	53 dias	2,72 $\pm$ 0,01	2,66 $\pm$ 0,02
	83 dias	1,28 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,05
	118 dias	0,36 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01
VR 043-43	53 dias	2,49 $\pm$ 0,04	2,47 $\pm$ 0,02
	83 dias	1,40 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,02
	118 dias	0,56 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02

A) Todas as medidas foram realizadas em triplicata

B) Dias após a floração

C) SD = Desvio Padrão

Uma grande variação dos valores de acidez foi detectada entre a segunda e terceira coleta das uvas cultivadas sobre o porta-enxerto Paulsen, cerca de 72%. Para a uva cultivada sob porta-enxerto VR 043-43 os valores de acidez titulável apresentaram um decréscimo contínuo.

Os valores de acidez titulável obtidos para a uva Cabernet Sauvignon cultivada sob os porta-enxertos 04343 e Paulsen 1103 foram relativamente baixos, 0,53 g/100mL e 0,33 g/100mL, respectivamente.

Quando comparados os resultados de pH e de acidez titulável, não é observado queda e aumento desses valores, como o acompanhado para as uvas cultivadas em

São Joaquim; este fato é explicado pelas diferentes datas de coleta das uvas. Para a uva Cabernet sauvignon cultivada em Videira não foi analisado a primeira fase de desenvolvimento, pois ao iniciar o trabalho não se sabia que existia uma variação de cerca de um mês na floração dessa uva entre a região de Videira e de São Joaquim.

A maturação da uva está intimamente associada às concentrações de ácidos málico e tartárico. Como estes apresentam valores de pKa diferentes ( $pK_1 = 3,46$  e  $pK_2 = 5,5$  e  $pK_1 = 3,04$  e  $pK_2 = 5,13$ , respectivamente), o pH de viragem da solução, o qual determina a acidez titulável, pode variar em função da proporção desses ácidos presentes. A Figura 77 apresenta o pH de viragem para as uvas cultivadas sob os dois porta enxertos estudados<sup>104</sup>. Observou-se que na data 25/02/04, 118 dias após a floração, o pH de viragem das uvas cultivadas sob o porta enxerto VR 043-43 foi menor, o que pode estar relacionado a uma maior quantidade de ácido tartárico.

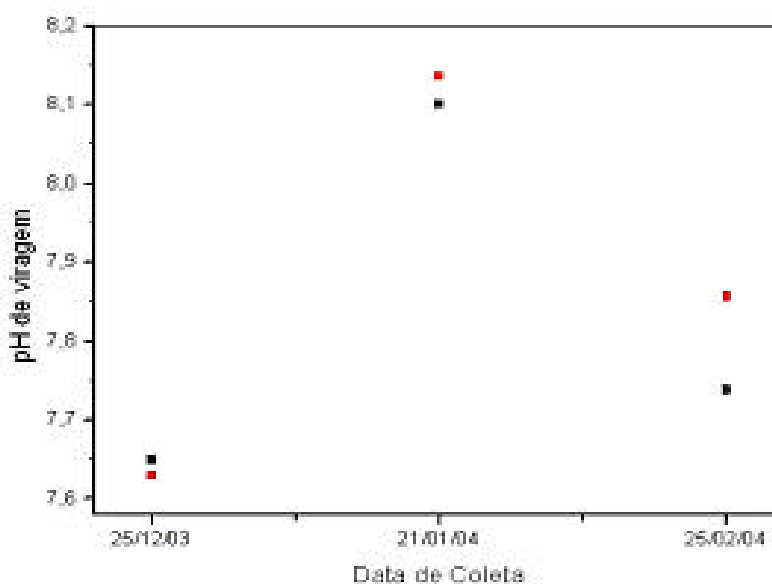


Figura 77: pH de viragem observado para a uva Cabernet sauvignon cultivada sob o porta enxerto Paulsen 1103 ( ) e VR 043-43 ( ).

#### 4.5.4 Determinação qualitativa e quantitativa da composição química por ressonância magnética nuclear.

As Figuras 78 e 79 apresentam os espectros (0 a 6ppm) de RMN de  $^1\text{H}$  dos sucos obtidos nas diferentes fases de desenvolvimento das uvas Cabernet sauvignon cultivada sob os porta-enxertos VR 043-43 e Paulsen 1103, em que foi aplicada a técnica de supressão do solvente, para o sinal da água.

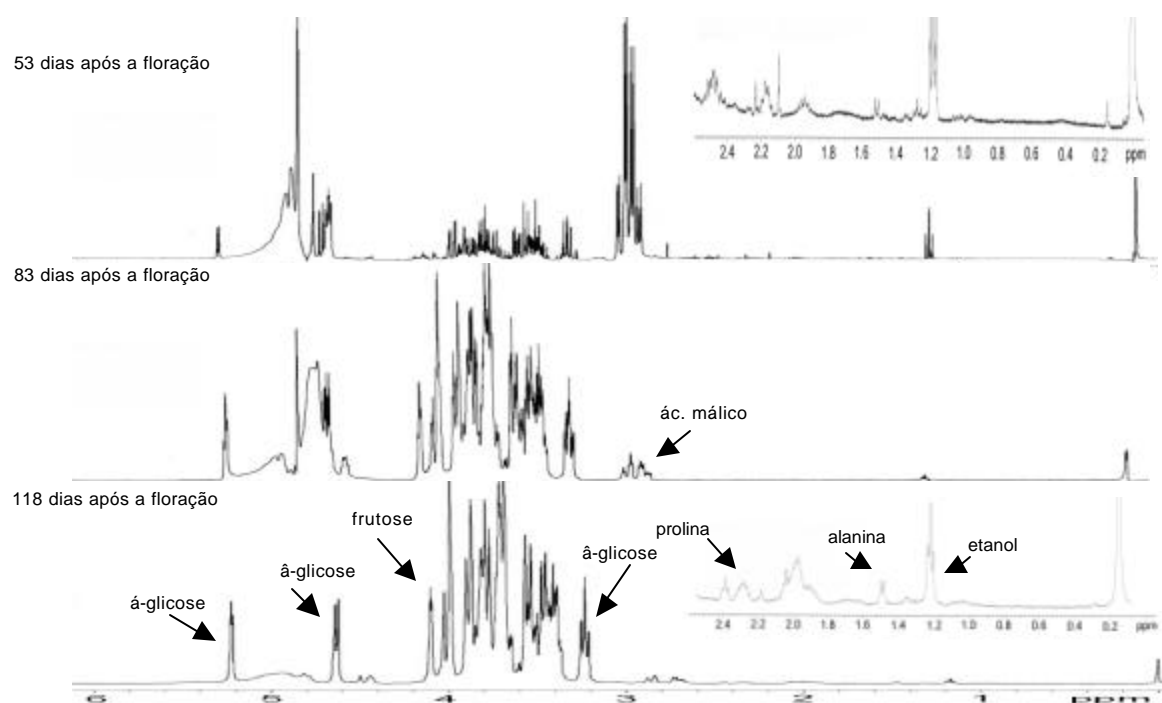
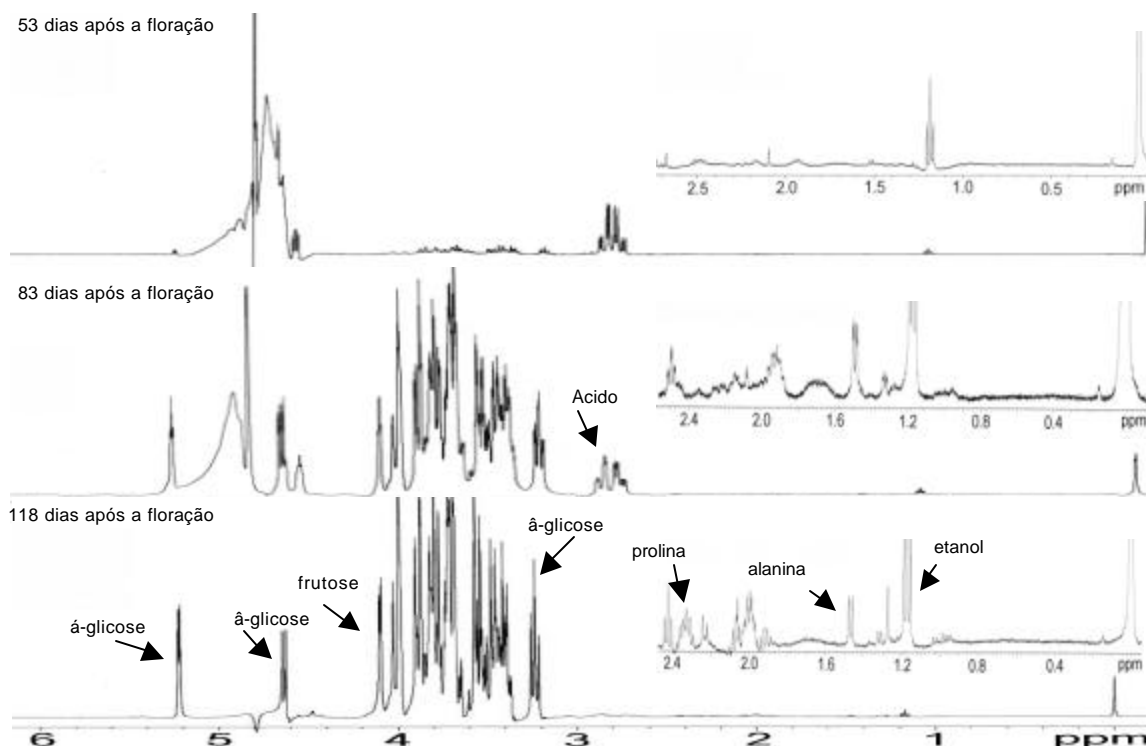


Figura 78: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet sauvignon cultivada sob o porta enxerto VR 043-43.



Figur

a 79: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet Sauvignon Paulsen 1103

Observou-se em todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  que não é possível obter o mesmo nível de saturação do sinal da água, em todos os experimentos realizados. As maiores dificuldades na supressão do sinal da água foram obtidas nos estágios de desenvolvimento próximos à data de floração. A melhor saturação do sinal foi obtida no último estágio, 118 dias após a floração. Este fato pode indicar que a forma do sinal da água é variável em cada estágio de crescimento da fruta<sup>114</sup>.

Ni and Eadsrel demonstraram que variações na largura da linha do sinal da água estão associadas à presença de água em diferentes domínios físicos de frutas<sup>115</sup>.

Acredita-se que nos primeiros estágios de crescimento as moléculas de água não se encontram livres e sim na forma de água estrutural o que pode gerar um aumento do tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) dos hidrogênios das moléculas de água. Outros autores já apresentaram comportamentos semelhante para as moléculas de água em bananas<sup>8</sup>, onde esses autores relatam que nos primeiros estágios de



crescimento as moléculas de água estão extremamente associadas à parede celular. No estudo com bananas foi observado que, à medida que a fruta cresce e atinge o estágio de maturação as moléculas de água tendem a residir no vacúolo das células e nesse caso, pode-se considerar este compartimento como uma solução diluída de vários metabólitos, em particular os açúcares. Os autores relatam que nesse estágio, os hidrogênios da água apresentam valores de relaxação transversal inferiores aos obtidos para a água pura, devido provavelmente, à alta viscosidade do meio, e à troca entre os hidrogênios da molécula de água e dos açúcares<sup>8</sup>.

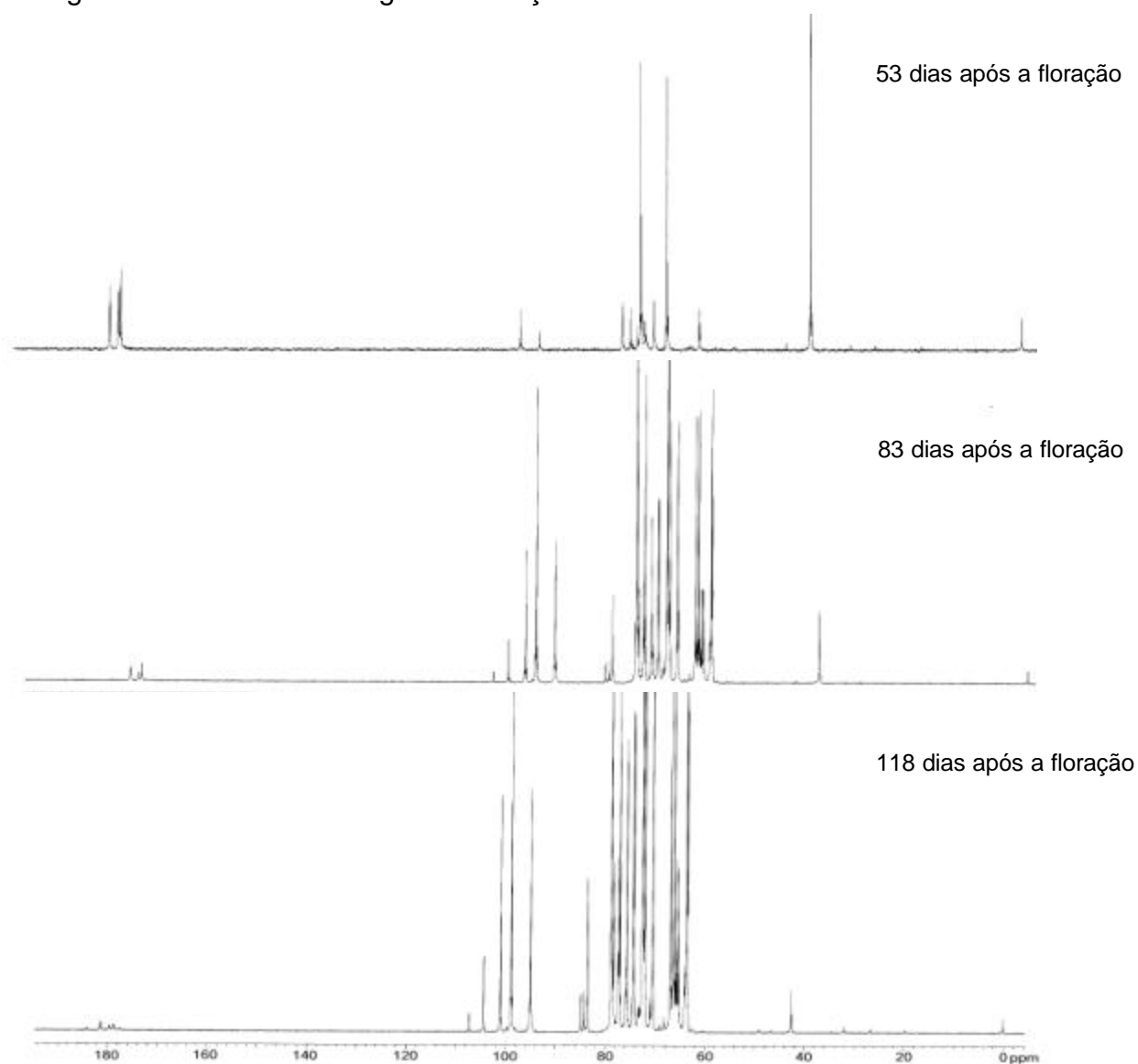


Figura 80: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet sauvignon sob porta enxerto VR 043-43.

As variações observadas nas diferentes regiões dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 80 e 81) mostraram claramente, que mudanças significantes na composição química da uva ocorrem com o crescimento e amadurecimento da fruta.

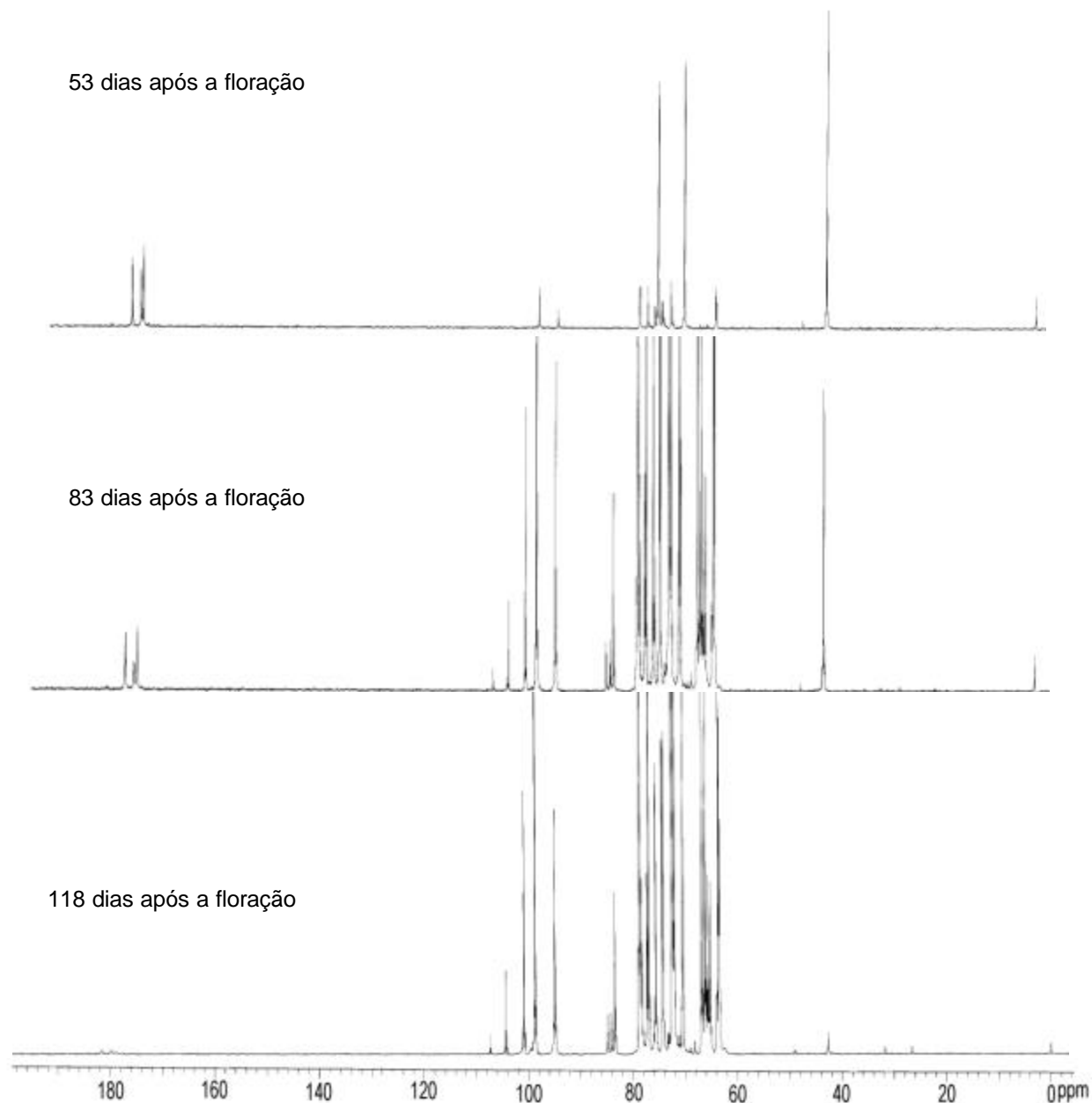


Figura 81: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (9,4 Tesla) nos diferentes estágios de desenvolvimentos. Cabernet sauvignon sob porta enxerto Paulsen 1103.

Para a quantificação foram analisados os sinais 2,34 ppm (multiplete) para a prolina; 1,49 ppm (dubleto) para a alanina; 2,64 (duplo dubleto) e 2,83 ppm (duplo dubleto) para o ácido málico; 3,24 ppm (duplo dubleto) para a  $\alpha$ -glicose; 4,11 ppm (dubleto) para a frutose; 5,23 (dubleto) para a  $\alpha$ -glicose.

A quantificação dos compostos foi realizada em triplicata em três amostras diferentes da mesma uva na mesma época de coleta, de acordo com a Equação 10 descrita no sub capítulo 4.3.4. Os resultados de quantificação, bem como seus desvios padrão estão descritos nas Tabelas 25 e 26.

Tabela 25: Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas obtidos para a uva Cabernet sauvignon sob porta-enxerto VR043-43

<b>Composição</b> $\text{gL}^{-1}$ (desvio padrão)	<b>Data da Coleta</b> Cabernet sauvignon VR043-43		
	53 <sup>A</sup>	83 <sup>A</sup>	118 <sup>A</sup>
$\alpha$ -glicose	0,475 (0,274)	31,5 (21,4)	82,5 (41,6)
Frutose	n.d. <sup>B</sup>	48,2 (11,6)	67,9 (26,3)
$\alpha$ -glicose	2,13 (0,109)	55,8 (12,5)	84,9 (34,7)
ácido málico	17,0 (4,86)	25,6 (12,3)	7,24. (3,13)
Prolina	n.d. <sup>B</sup>	n.d. <sup>B</sup>	1,34 (0,989)
Alanina	n.d. <sup>B</sup>	0,0339 (0,0257)	0,326 (0,301)

C) Dias após a floração

D) n.d. : Valor não determinado

Tabela 26: Valores de concentrações em gramas/litro ( $\text{gL}^{-1}$ ) e desvio padrão das medidas obtidos para a uva Cabernet sauvignon sob porta-enxerto Paulsen 1103

<b>Composição</b> $\text{gL}^{-1}$ (desvio padrão)	<b>Data da Coleta</b>		
	Cabernet sauvignon Paulsen 1103		
	53 <sup>A</sup>	83 <sup>A</sup>	118 <sup>A</sup>
á-glicose	1,40 (0,675)	56,1 (27,6)	62,9 (26,5)
Frutose	n.d. <sup>B</sup>	42,9 (17,4)	84,4 (10,2)
â-glicose	2,23 (0,325)	58,1 (20,2)	94,1 (17,6)
ácido málico	16,6 (0,434)	25,1 (4,65)	2,86 (1,85)
Prolina	n.d. <sup>B</sup>	n.d. <sup>B</sup>	0,771 (0,286)
Alanina	0,0143 (0,00360)	0,110 (0,00281)	0,151 (0,0886)

A) Dias após a floração

B) n.d. : Valor não determinado

O início da maturação das uvas Cabernet sauvignon cultivadas em Videira pareceu ocorrer entre 53 e 83 dias após a floração, quando nesta época observou-se um aumento da concentração dos açúcares. Foi também observado um aumento da concentração do ácido málico que, posteriormente, sofreu uma considerável queda de concentração.

Os aminoácidos alanina e prolina aumentam de concentração com a maturação da fruta. Levando em consideração que as uvas estejam sob o mesmo terreno e mesma zona climática, as variações observadas nas concentrações dos aminoácidos bem como nos demais compostos, podem ser atribuídas, provavelmente, à variações na taxa de absorção dos nutrientes do solo em função do tipo de porta enxerto utilizado.

Os compostos nitrogenados são macronutrientes essenciais para as leveduras e, são requeridos para o crescimento celular, multiplicação celular e para a atividade das leveduras<sup>116</sup>.

O controle da concentração de aminoácidos no mosto de uvas é de grande importância do ponto de vista biotecnológico do processo de fermentação, pois a deficiência de compostos nitrogenados no mosto está associada à formação de compostos sulfurados, enquanto que a concentração excessiva de compostos nitrogenados pode estar associada a níveis elevados de etil carbamatos, encontrados nos vinhos<sup>117</sup>.

A prolina é o aminoácido mais abundante em mostos de uvas, no entanto, estudos demonstram que esse aminoácido não é utilizado pelas leveduras durante o processo de fermentação e que sua concentração tende a aumentar durante esse processo bioquímico, devido ao fato de que as leveduras assimilam nitrogênio provenientes de aminoácidos alfa-amino-nitrogenados e amônia<sup>116,118</sup>.

Seqüencialmente, alanina e arginina são considerados os aminoácidos mais abundantes nos mostos de uvas. Sendo esses utilizados pelas leveduras como fontes de nitrogênio para promoção do crescimento e atividade. Neste trabalho não foi estudada a presença de arginina na uva durante seu ciclo de desenvolvimento<sup>118</sup>.

Outro fato de relevada importância quanto à concentração de aminoácidos nos mostos está na relação direta destes aminoácidos com as propriedades organolépticas especialmente flavorizantes, relatadas na literatura. A formação de compostos flavorizantes em vinhos durante seu envelhecimento, pode ocorrer devido à reação de adição nucleofílica de grupamentos amina dos aminoácidos aos grupamentos carbonílicos, em compostos á-dicarconílicos e á-hidroxi cetonas<sup>119</sup>.

A presença de aminoácidos nos vinhos pode ainda estar relacionada à estrutura desta bebida, permitindo uma sensação gustativa mais persistente e duradoura<sup>120</sup>.

Não foi encontrada na literatura, determinação de alfa e beta glicose em uvas durante os estágios de desenvolvimento. A quantificação desses pode vir a contribuir para o estudo bioquímico da ação de enzimas invertases presentes nas uvas e que são responsáveis pela conversão da sucrose em hexoses (glicose e frutose) e na seleção das leveduras utilizadas nos processos de fermentação para a elaboração dos vinhos<sup>121</sup>

Comparando os resultados obtidos para a análise de ácido e açúcares na uva Cabernet sauvignon cultivada sob os diferentes porta enxertos, observa-se que na data de colheita (118 dias após a floração), todos os resultados mostraram um maior desvio padrão para a uva cultivada sob o porta enxerto VR043-43, indicando uma certa heterogeneidade na composição química. Este fato pode ser atribuído provavelmente às variações físicas observadas para esta mesma uva.

Não foi observado alterações negativas consideráveis na composição da uva cultivada sob o porta enxerto VR 043-43, em virtude do maior vigor induzido por esse porta enxerto, originando cachos maiores, com maior número de bagas e maior quantidade de cachos por pé (cerca de 35 cachos por pé). Contrariamente, mesmo com essas características as uvas dessa vinha apresentaram bagas de menor tamanho, uma maior concentração de sólidos totais, aminoácidos e uma maior teor de ácido málico quando comparadas com a uva Cabernet sauvignon cultivada sobre o porta enxerto Paulsen 1103 nos municípios de Videira e São Joaquim.

## 5. CONCLUSÕES

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear parece ser um bom método quantitativo para a determinação de compostos majoritários (açúcares e ácidos) e minoritários (aminoácidos) em amostras de uvas e vinhos.

A relação área normalizada do sinal de cada substância em estudo e a sua concentração apresentou um comportamento linear, com coeficientes de linearidade da reta (R) maior de 0,99. Desta forma, pode-se considerar a área normalizada do sinal obtido nas análises de RMN de  $^1\text{H}$  como uma medida direta da concentração de uma dada substância.

A precisão das medidas das áreas dos sinais foi influenciada pelo grau de multiplicidade dos sinais, pois o maior desvio das medidas foi observado para substâncias cujo sinal utilizado para a sua identificação foi um multiplete (prolina). A presença de sinais laterais provenientes de outras substâncias também interferiu na precisão das medidas. A medida da integral para a  $\alpha$ -glicose e frutose (3,00 – 4,50 ppm), apresentou menor precisão devido a presença de outros sinais, pertencentes a açúcares, ácidos e aminoácidos. Outro fator que parece interferir na precisão das medidas é a presença de sinais de grande intensidade, como o sinal da água em 4,7 ppm.

Limites de detecção na ordem de  $0,2\text{gL}^{-1}$  foram obtidos para as medidas da concentração de ácido succínico em espectrômetro de RMN de 4,7 Tesla. Limites de quantificação variando de  $0,016\text{gL}^{-1}$  a  $6,000\text{gL}^{-1}$  foram obtidos para as substâncias analisadas por espectroscopia de RMN de 9,4 Tesla.

Acredita-se que os mesmos fatores relatados para as diferenças obtidas na precisão das medidas para as diferentes substâncias, parecem estar presentes também na determinação do limite de quantificação, pois o menor limite de quantificação foi obtido para alanina, no qual o sinal monitorado é um dublete em uma região do espectro desprovida de outros sinais.

Um fator relevante para as análises quantitativas de substâncias presentes em baixas concentrações por RMN de  $^1\text{H}$ , é a possibilidade de supressão de sinais de grande intensidade referente a altas concentrações de outras substâncias. Nesse caso

o uso de técnicas de supressão do sinal de alta intensidade resulta em uma melhora na relação sinal/ruído e no limite de quantificação, para a análise de compostos minoritários.

A RMN de  $^1\text{H}$  possibilitou a identificação de ácidos, glicerol, aminoácidos de forma direta em amostras de vinhos brancos. Esta pode ser uma ferramenta viável para o estudo de processos fermentativos (fermentação alcoólica e malolática) durante a elaboração do vinho.

Na análise de vinhos utilizando diferentes métodos de concentração das amostras (liofilização e fluxo de nitrogênio) foi constatado que as condições de liofilização não são facilmente controladas. Para obter uma boa reprodutibilidade, a pressão e a temperatura devem ser rigorosamente controladas. A eliminação total do etanol presente nas amostras não foi obtida pela técnica de liofilização. No entanto, a concentração dos vinhos brancos brasileiros por meio de fluxo de nitrogênio, foi possível a eliminação total do etanol presente nas amostras e a identificação de 2,3 butilenoglicol e alanina na região de alto campo do espectro (1,0 – 1,5 ppm).

A RMN de  $^1\text{H}$  pode ser usada para identificar alterações de composição química nos vinhos, relacionadas com variações na composição do mosto de uvas ou com as diferentes práticas utilizadas na elaboração dos vinhos.

Na análise de uvas cultivadas em São Joaquim e Videira, verificou-se que as variações físicas (evolução do peso médio dos cachos, do número de bagas por cacho, do peso da ráquis e do comprimento das bagas), os teores de açúcar obtidos por medidas de  $^{\circ}\text{Brix}$  e os valores de acidez total alcançados para todas as amostras analisadas nas diferentes fases de desenvolvimento, podem indicar que as variedades estudadas apresentam boa adaptação na região do planalto catarinense (São Joaquim) e do vale do Rio do Peixe (Videira).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  apresentam sinais de maior intensidade, referentes aos compostos majoritários (glicose, frutose e ácido málico), os sinais de menor intensidade são correspondentes aos compostos minoritários (polifenóis e aminoácidos). Através de experimentos de DEPT e correlação multinuclear foi possível a identificação dos dois principais sacarídeos, D-glicose e D-frutose; dos principais ácidos orgânicos, ácido málico e ácido tartárico e dos aminoácidos prolina e alanina



encontrados nas amostras de uva. Sendo esses compostos, com exceção do ácido tartárico, quantificados nas amostras analisadas.

Os valores de concentração obtidos a partir das análises quantitativas de açúcares e ácidos, realizadas por RMN de  $^1\text{H}$  foram coerentes com os resultados das análises de medida de  $^\circ\text{Brix}$  e acidez total.

De maneira geral, todas as substâncias quantificadas nas uvas analisadas na época de colheita apresentaram valores concentrações dentro das faixas encontradas para uvas Vitis viníferas cultivadas em outros países (glicose de  $58 - 166 \text{ gL}^{-1}$ ; frutose de  $48 - 166 \text{ gL}^{-1}$ ; ácido málico de  $1,4 - 8,7 \text{ gL}^{-1}$ ; alanina  $0,01 - 0,9 \text{ gL}^{-1}$  e prolina  $0,5 - 0,8 \text{ gL}^{-1}$ ), podendo ser um indicativo positivo da qualidade das uvas cultivadas em Santa Catarina<sup>90,96,108,109, 111, 113, 122</sup>.

Os resultados de concentração obtidos para as diferentes substâncias estudadas, demonstraram que a técnica de RMN  $^1\text{H}$  é uma ferramenta viável para estudos de diversidades químicas observadas entre uvas de variedades diferentes, uvas cultivadas em diferentes regiões e por diferentes métodos de cultivo.

As variações de composição químicas observadas para o ácido málico e para os açúcares obtidos pelas análises quantitativas de RMN  $^1\text{H}$ , possibilitam a identificação da fase de início de maturação, chamada de veração, a determinação desta etapa de desenvolvimento é fator primordial para a determinação da data de colheita da uva, o que é importante para obtenção de uvas com alta qualidade de vinificação.

Pelo fato da RMN ser uma ferramenta de elucidação estrutural, foi possível a distinção da glicose nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  glicose bem como a quantificação dos mesmos.

A RMN permite análises rápidas, sem destruição da amostra, para a identificação e quantificação de substâncias com diferentes funções químicas (ácidos, açúcares e aminoácidos) em uvas (matrizes complexas), sem nenhuma etapa de pré-preparação das amostras, utilizando pouca quantidade de solvente e padrão interno de fácil obtenção.

Inovações em “*software*” e “*hardware*” bem como, a introdução de novos conceitos como a RMN multidimensional, a RMN de detecção inversa, os marcadores isotópicos em biomoléculas e a excitação seletiva têm contribuído para melhorar e otimizar os experimentos de RMN, possibilitando uma evolução dessa técnica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHRISTAKI, T., TZIA, C. Quality and safety assurance in winemaking. **Food Control**, v. 13, n., p. 503 - 517, 2002.
2. Produção de vinhos finos. **Agropecuária Catarinense**, v. 16, n.2, p. 27-32, 2003.
3. BEVILAQUA, G.A.P. Avaliação físico-química durante a maturação de videiras cultivadas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.3, p. 151 – 156, 1995.
4. BELLON, V., CHO, S.I., KRUTZ, G.W., DAVENEL, A. Ripeness sensor development based on nuclear magnetic resonance. **Food Control**, p. 45-48, January, 1992.
5. CHEN, P., MCCARTHY, M.J., KIM, S.M., ZION, B. Development of a high-speed NMR technique for sensing maturity of avocados. **Transaction of American Society of Agricultural Engineers**, v. 39(6), p. 2205 – 2209, 1996.
6. GIL, A. M., DUARTE, I. F., DELGADILLO, I., COLQUHOUN, I. J., CASUSCELLI H. E., SPRAUL, M. Study of composition changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n., p. 1524 - 1536, 2000.
7. ANDAUR, J.E., GUESALAGA, A.R., AGOSIN, E.E., GUARINI, M.W., IRARRÁZVAL, P. Magnetic resonance imaging for nondestructive analysis of wine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 165 – 170, 2004.
8. RAFFO, A., GIANFERRI, R, BARBIERI R., BROSIO, E. Ripening of banana fruit monitored by water relaxation and diffusion  $^1\text{H}$ -NMR measurements. **Food Chemistry**, v. 89 (1), p. 149 – 158, 2004.

9. BRESCIA, M. A., CALDAROLA V., GIGLIO, A., BENEDETTI, D, FANIZZI, F. P., SACCO, A. Characterization of the geographical origin of Italian red wine based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determination. **Analytica Chimica Acta**, n. 21716, p. 1-10, 2001.
10. KOSIR, I. J., & KIDRIC, J. Identification of amino acids in wine by one and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n., p. 50 - 56, 2001.
11. KOSIR, J. I., KOCJANCIC, M., OGRINC, N., KIDRIC, J. Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). **Analytica Chimica Acta**, v., n. 429, p. 195-206, 2001.
12. OGRINC, N., KOSIR, I.J., KOCJANCIC, M., KIDRIC, J. Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n., p. 1432 - 1440, 2001.
13. KOSIR, I. J., KIDRIC, J. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. **Analytica Chimica Acta**, v., n. 458, p. 77-84, 2002.
14. BRESCIA, A. M., KOSIR, J.I., CALDAROLA, V., KIDRIC, J., SACCO, A. Chemometric classification of Apulian and Slovenian wines using  $^1\text{H}$  NMR and ICP-OES together with HPICE data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n., p. 21-26, 2003.

15. GLADDEN, F. L. Nuclear magnetic resonance in chemical engineering: Principles and applications. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 20, p. 3339 - 3408, 1994.
16. IBAÑEZ, E., CIFUENTES, A. New analytical techniques in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 41(6), p. 413 – 450, 2001.
17. BELTON, P. S., DELGADILLO, I., HELMES, E., NICHOLSON, J. K., SPRAUL, M. Use of high-field <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for the analysis of liquid food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n., p. 1483 - 1487, 1996.
18. SKOOG, D. A., HOLLER, J.F., NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. Capítulo 19, quinta edição ed.; Porto Alegre: Bookman, 2002.
19. RUTLEDGE, D. N. Characterization of water in agro-food products by time domain-NMR. **Food Control**, v. 12, n., p. 437 - 445, 2001.
20. SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F.X. **Spectrometric identification of Organic Compounds**. sixth edition ed.; Toronto: John Wiley & Sons, 1997.
21. DEROME, A. E. **Modern NMR techniques for chemistry research**. Organic Chemistry Series, Series editor: J.E. Baldwin, Pergamon, v. 6, 1990.
22. LINDON, J.C., NICHOLSON, J.K. Recent advances in high-resolution NMR spectroscopic methods in bioanalytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v.6, n.4, p. 190 – 200, 1997.
23. SIMONEAU, C., MCCARTHY, M.J., GERMAN, J.B. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for food systems. *Food Research International*, v.26, p. 387 – 398, 1993.

- 24.EADS, T.M., BRYANT, R.G. High-resolution proton NMR spectroscopy of milk, orange juice, and apple juice with efficient suppression of water peak. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, p. 834 – 837, 1986.
- 25.CHOI, Y.H., KIMA, H.K., WILSON, E.G., ERKELENS, C., TRIJZELAAR, B., VERPOORTE, R. Quantitative analysis of retinol and retinol palmitate in vitamin tablets using  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v.512, p. 141 – 147, 2004.
- 26.SOUZA, A. A., LAVERDE, A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1022-1026, 2002.
- 27.NAKANISHI, K. **One-dimensional and two-dimensional NMR spectra by modern pulse techniques**. Tokyo: Kodansha, 1990.
- 28.ABLETT, S. Overview of NMR application in food science. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 246 - 250, 1992.
- 29.BELLOQUE, J., RAMOS, M. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. **Food Science & Technology**, v.10, p. 313 – 320, 1998.
- 30.HU, F., FURIHATA, K., ITO-ISHIDA, M., KAMINOGAWA, S., TANOKURA, M. Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: Analysis of existing states of compounds and detection of new compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4969 – 4974, 2004.
- 31.BRIANDET, R., KEMSLEY, K.E., WILSON, R.H. Discrimination of *Arabica* and *Robusta* in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 170 – 174, 1996.

- 32.CHARLTON, A., FARRINGTON, W.H.H., BRERETON, P. Application of  $^1\text{H}$  NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: Quality control and authenticity of instant coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3098 – 3103, 2002.
- 33.TAVARES, L.A., FERREIRA, M.M., FERREIRA, A.G., RMN  $^1\text{H}$  e análise de componentes principais na classificação de cafés. VII Jornada Brasileira de Ressonância Magnética Nuclear. Livro de Resumos p. 173 – 174, 2002.
- 34.BOSCO, M., TOFFANIN, R., PALO, D., ZATTI, L., SEGRE, A. High-resolution  $^1\text{H}$  NMR investigation of coffee. [Journal of the Science of Food and Agriculture](#), v. 79(6), p. 869 – 878, 1998.
- 35.GALL, G., COLQUHOUN, I. J., DEFERNEZ, M. Metabolite Profiling Using  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy for Quality Assessment of Green Tea, *Camellia sinensis* (L.). [Journal of the Science of Food and Agriculture](#), v. 52, p. 692 – 700, 2004.
- 36.CLAXSON, A. W.D., HAWKESB, G. E., RICHARDSON, D. P., NAUGHTON, D. P., HAYWOODAYB, R. M., CHANDE, C. L., ATHERTON, M., LYNCH, E. J., GROOTVELD M. C. Generation of lipid peroxidation products in culinary oils and fats during episodes of thermal stressing: a high field  $^1\text{H}$  NMR study. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, n. 355, p. 81 – 90, 1994.
- 37.WANASUNDARA, U. N., SHAHIDI, F., JABLONSKIB, C.R. Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils. **Food Chemistry**, v. 52, p. 249 – 253, 1995.
- 38.GUILLE, M. D., RUIZ A. High resolution  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends in Food Science & Technology**, n. 12, p. 328 – 338, 2001.

- 39.VLAHOV, G. Application of NMR to the study of olive oils. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 35, p. 341 – 357, 1999.
- 40.MANNINA, L., PATUMI, M., PROIETTI, N., BASSI, D., SEGRE, A.L. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. [Journal of the Science of Food and Agriculture](#), v. 49(6), p. 2687 – 2696, 2001.
- 41.BELTON, S. P., COLQUHOUN, J.I., KEMSLEY, K.E., DELGADILLO, I., ROMA, P., DENNIS, J.M., SHARMAN, M., HOLMES, E., NICHOLSON, K.J., SPRAUL, S. Application of chemometrics to the  $^1\text{H}$  NMR spectra of apple juice: discrimination between apple varieties. **Food Chemistry**, v. 6, n. 1/2, p. 207-213, 1998.
- 42.GALL, G., PUAUD, M., COLQUHOUN, J.I. Discrimination between orange juice and pulp wash by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 580 - 588, 2001.
- 43.VOGELS, E. W. T. J., TERWEL, L., TAS, C.A., BERG, F., DUKE, F., GREEF, J. Detection of adulteration in orange juice by new screening method using proton NMR spectroscopy in combination with pattern recognition techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 175 - 180, 1996.
- 44.SOBOLEV, A.P., SEGRE, A., LAMANNA, R. Proton high-field NMR study of tomato juice. **Magnetic Resonance In Chemistry**, v.41, p. 237 – 245, 2003.
45. CHAUGHULE, R.S., MALI, P.C., PATIL, R.S., JOSHI, G.D., LO, Y.M. Magnetic resonance spectroscopy study of sapota fruits at various growth stages. **Innovation Food Science & Emerging Technologies**, v.3, p. 185 – 190, 2002.



46. ZION, B., CHEAN, P., McCARTHY, J. Nondestructive quality evaluation of fresh prunes by NMR spectroscopy. **Journal Science Food Agriculture**, v.67, p. 423 – 429, 1995.
47. CLARK, C.J., DRUMMOND, L.N., MAcFALL, J.S., Quantitative NMR imaging of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) during growth and ripening. **Journal Science Food Agriculture**, v.78, p. 349 – 358, 1998.
48. BISCEGLI, C.I., CRESTANA, S. Novo método para avaliação não-destrutiva do interior de frutas. **Circular Técnica EMBRAPA**, n.5 (ISSN 1413-9545), 1996.
49. DUARTE, I., BARROS, A., BELTON, P. S., RIGHELATO, R., SPRAUL, M., HUMPER, E., GL, A. M. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2475 - 2481, 2002.
50. GIL, A. M., DUARTE, I. F., GODEJOHANN, M., BRAUMANN, U., MARASCHIN M., SPRAUL, M. Characterization of the aromatic composition of some liquid foods by nuclear magnetic resonance and mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, n. 488, p. 35-51, 2003.
51. GIL, A.M., DUARTE, I., CABRITA, E., GOODFELLOW, B.J., SPRAUL, M., KERSSEBAUM, R. Exploratory application of diffusion ordered spectroscopy to liquid foods: an aid toward spectral assignment. **Analytica Chimica Acta**, n. 506, p. 215 – 223, 2004.

52. SOUZA, S.I. Tradição e evolução. **Vinho Magazine**, n. 18, p. 50 - 52, 2001.
53. ALVES, M.M. Vinhos: A arte da França. A viticultura no Brasil. Segunda edição, ed.; São Paulo:DBA Artes Gráficas, 1997.
54. SOUZA, S.I. O vinho que jorra do sul. **Vinho Magazine**, n. 19, p. 64-66, 2001.
55. SOUZA, S.I. Vinho brasileiro: Caminhos diversos desenharam o sucesso. **Vinho Magazine**, n. 23, p. 44-46, 2001.
56. SOUZA, S.I. Vinho: O Brasil caminha para a demarcação de origem. **Vinho Magazine**, n. 21, p. 49-52, 2000.
57. SOUSA, J.S.I. Uvas para o Brasil. Segunda edição, ed.; São Paulo: FEALQ, 1996.
58. UVIBRA: União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: <  
[http://www.uvibra.com.br/pdf/safra\\_uva1998-2004.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2004.pdf)>. Acesso em 10 de maio de 2005.
59. POZO-BAYÓN, M.A., POLO, M.C., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J., PUEYO, E. Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. *Food Chemistry*, n.86, p. 413 – 419, 2004.
60. BRUNET, P. Le vin et le vins au restaurant. Elaboration – Origines – Degustation – Conservation – Service. Nouvelle édition, ed. Paris: BPI, 1999.
61. CATALUÑA, E. As uvas e os vinhos. Coleção Agricultor: Vitivinicultura. Terceira edição, ed. São Paulo: Editora Globo S.A., 1991.
62. WESTPHALEN, S.L., MALUF, J.R.T. Caracterização das áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L. nas regiões da Serra do Nordeste e Planalto do estado do Rio Grande do Sul. Brasília: **Embrapa Comunicações para Transferência de Tecnologia**; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000.

63. TONIETTO, J., CARBONNEAU, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. **Agricultural and Forest Meteorology**, In Press.
64. REYNIER, A., Manual de viticultura. Quinta edição, ed., Madrid: Mundi-Prensa, 1995.
65. Artigo Técnico: Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/portaenx.html>. Acesso em 05 de maio de 2005.
66. UVIBRA: União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: <[http://www.uvibra.com.br/noticia\\_280305\\_miolo.htm](http://www.uvibra.com.br/noticia_280305_miolo.htm)>. Acesso em 20 de maio de 2005.
67. SCHIAVO, R. A super safra. **Vinho Mazine**, n.28, p. 18 – 22, 2002.
68. COOMBE, B.G. Distribution of solutes within the developing grapes berry in relation to its morphology. **America Journal of Enology and Viticulture**, v. 38, p. 120 – 127, 1987.
69. OUGH, C.S., AMERINE, M.A. Methods for analysis of must and wines. Second edition, ed. New York: Wiley, 1988.
70. OUGH, C.S. Tratado básico de enologia. Ed.; Zaragoza: ACRIBA S.A., 1996.
71. TEIXEIRA, E. Influência da técnica de hiperoxidação sobre a fração aromática e características sensoriais de vinhos monovarietais. Trabalho apresentado a banca do concurso para professora titula da Universidade Federal de Santa Catarina, 1994.
72. PATO, O., O vinho: Métodos modernos de fabrico tratamento e conservação. Terceira edição, ed., Lisboa: L.C.E., 1999.
73. REVEL, G., MARTIN, N., PRIPIS-NICOLAU, L., LONVAUD-FUNEL, A., BERTRAND, A. Contribution to the Knoledge of malolactic fermentation influence on

- wine aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4003 – 4008, 1999.
74. BRUNET, A. Le vin et les vins étrangers. Origines – Production – Cépages – Caractères – Accords vins et mets. Édition mise à jour, ed., Paris: BPI, 1999.
75. ANVISA – Resolução RE número 475 de 19 de março de 2002. Artigo 2º parágrafo 1.7. DOU de 20 de março de 2002.
76. XU, Q., KLEES, J., TEYRAL, J., CAPEN, R., HUANG, M., STURGESS, A.W., HENNESSEY, J.P., WASHABAUGH, M., SITRIN, R., ABEYGUNAWARDANA, C. Quantitative nuclear magnetic resonance analysis and characterization of the derivatized Haemophilus influenzae type b polysaccharides intermediate for PedvazHIB. **Analytical Biochemistry**, n. 337, p. 235 245, 2005.
77. SAINT´PIERRE, T.D. Desenvolvimento de medos analíticos para a determinação de metais traços em álcool combustível e em gasolina por espectrometrias atômica. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina , 2004.
78. MARTELL, A.E.; MOTEKAITIS, R.J. Determination and use of stability constants, ed., New York: VCH Publishers, 1992.
79. RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771 – 780, 2004.
80. SALEM, A.A., MOSSAB, H.A., BARSOUMB, B.N. Quantitative determinations of levofloxacin and rifampicin in pharmaceutical and urine samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**. In Press.
81. TALEBPOUR, Z., HAGHGOOB, S., SHAMSIPUR, M. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa,

- carbidopa and methyldopa in human serum and pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta.**, n. 506, p. 97–104, 2004.
82. SMALLCOMBE, S.H., PATT, S.L., KEIFER, P. A. WET solvent suppression and its applications to LC NMR and high-resolution NMR spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance, Series A**, n. 117, p. 295–303, 1995.
83. LONVAUD-FUNEL, A. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. **FEMS Microbiology Letters**, n. 126, p. 209 – 214, 1995.
84. NEVES, A.R., POOL, W. A., KOK, J., KUIPERS, O.P., SANTOS, H. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – The input from in vivo NMR. **FEMS Microbiology Reviews**. In Press.
85. HARRISON, V.S., ROSE, A.H. The Yeast. Volume 3, Second edition, ed: Academic Press, 1989.
86. RIZZON, L.A., MIELE, A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 23, p. 156 – 161, 2003.
87. RIZZON, L.A., MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 22 (2), p. 192 – 198, 2002.
88. CÀSTINO, M. La qualità dell'uva. **Vini d'Italia**, Brescia v.34, n.5, p.23-40, 1992.
89. DAUDT, C.E., SIMON, J.A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do rio grande do sul. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 697 – 701, 2001.
90. COOMBE, B.G. Research on development and ripening of the grape berry. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.43, n.1, p. 101 – 110, 1992.
91. Escrito por: James Kennedy, Department of Food Science & Technology Oregon State University, Corvallis, OR. Disponível em

<<http://www.practicalwinery.com/JulyAugust02/julaug02p14.htm>> Acesso em 30 de maio de 2005.

92. RIZZON, L.A., MIELE, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet sauvignon e Cabernet franc. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p. 511 – 515, 2002.
93. LAMIKANRA, O., INYANG, I.D., LEONG, S. Distribution and effect of grapes maturity on organic acid content of red Muscadine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 3026 - 3028, 1995.
94. TORIJA, M.J., BELTRAN, G., NOVO, M., POBLET, M., ROZÈS, N., MAS, A., GUILLAMÓN, J.M. Effect of organic acids and nitrogen source an alcoholic fermentation: Study of their buffering capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, , p. 916 - 622, 2003.
95. LAMIKANRA, O. Changes in organic acid composition during fermentation and aging of Noble muscadine wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45,, p. 935 - 937, 1997.
96. CARROLL, D.E., MARCY, J.E. Chemical and physical changes during maturation of Muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 33, n. 3, p. 168 – 172, 1982.
97. DARIAS-MARTÍN, J., SOCAS-HERNÁNDEZ, A., DÍAZ-ROMERO, C., DÍAZ-DÍAZ, E. Comparative study of methods for determination of titrable acidity in wine. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 555 – 562, 2003.
98. PEYNAUD, E., BLOUIN, J. Le goût du vin. Troisieme edition, ed. Paris: DUNOD, 1996.
98. ESCOBAL, A., GONZALEZ, I., IRIONDO C., & LABORRA, C. Determination of acids and volatiles compounds in red Txakoli wine by high-performance liquid

- chromatography and gas chromatography. **Journal Chromatography. A** n. 823, p. 349 – 354, 1998.
100. MASÁR, M., KANIANSKY, D., BODOR, R., JÖHNCK M., STANISLAWSKI, B. Determination of organic acids and inorganic anions in wine by isotachophoresis on planar chip. **Journal Chromatography. A**, n. 916, p. 167 – 174, 2001
101. ESCOBAL, A., GONZALEZ, I., IRIONDO C., & LABORRA, C. Liquid chromatography determination of organic acids in txakoli from Bizkaia. **Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 381 – 384, 1997.
102. CHOI, Y.H., KIM, K.H., WILSON, E.G., ERKELENS, C. TRIJZELAAR, B., VERPOORTE, R. Quantitative analysis of retinol and retinol palmitate in vitamin tablets using <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta** n. 512, p. 141–147, 2004.
103. WELLS, R.J., HOOK, J.M., AL-DEEN, T. S., HIBBERT, D. B. Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) Spectroscopy for Assessing the Purity of Technical Grade Agrochemicals: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Sodium 2,2-Dichloropropionate (Dalapon Sodium). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 3366 - 3374, 2002.
104. GUERRA, C.C., DAUD, C.E., RIZZON, L.A. Evolução dos teores dos ácidos tartárico e málico durante a maturação de uvas tintas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.3., p. 479 – 491, 1992.
105. KLIEWER, W.M. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. **Journal of Food Science**, v. 35, p. 17 – 21, 1970.

106. FREEMAN, B.M., KLIEWER, W.M. Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on carignane vines. II. grape and wine quality. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 34, n. 3, p. 197 – 207, 1983.
107. MATTHEWS, M.A., ANDERSON, M.M. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, n. 4, p. 313 – 320, 1988.
108. HERNÁNDEZ-ORTE, P., COCHO, J.F., FERREIRA, V. Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solution and chemometric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 2891 - 2899, 2002.
109. SOUFLEROS, E.H., BOULOUMPASI, E., TSARCHOPOULOS, C., BILIADERIS, C.G. Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. **Food Chemistry**, v.80, p. 261 – 273, 2003.
110. AGRONEGÓCIO: Catarinenses apostam na uva vinífera Produtores de regiões frias descobrem importância dos vinhos finos. Disponível em: <<http://www6.via-rs.com.br/esteditora/correio/4856/right.htm>> Acesso em 30 de maio de 2005.
111. SOYER, Y., KOCA, N., KARADENIZ, F. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 629–636, 2003.
112. Disponível em <[http://www.rapazfreres.ch/Cepages/cep\\_cabernet\\_sauvignon.htm](http://www.rapazfreres.ch/Cepages/cep_cabernet_sauvignon.htm)> Acesso em 10 de janeiro de 2005.



113. VARANDAS, S., TEIXEIRA, M. J., MARQUES, J. C. AGUIAR, A., ALVES, A., BASTOS, M. M.S.M., Glucose and fructose levels on grape skin: interference in *Lobesia botrana* behaviour. **Analytica Chimica Acta**, n. 513, p. 351–355, 2004.
114. CHO, S.I., BELLON, V., EADS, T.M., STROSHINER, L., KRUTZ, G.W. Sugar content measurement in fruit tissue using water peak suppression in high resolution  $^1\text{H}$  magnetic resonance. **Journal of Food Science** v. 56, n. 4, p. 1091 – 1094, 1991.
115. NI, Q. W., & EADS, T.M. Liquid-phase composition of intact fruit tissue measured by high-resolution proton NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1026 – 1034, 1993.
116. HERNANDEZ-ORTE, P., IBARZ, M.J., CACHO, J., FERREIRA, V. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. **Food Chemistry**. In Press.
117. SOUFLEROS, E.H., BOULOUMPASI, E., TSARCHOPOULOS, C., BILIADERIS, C.G., Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. **Food Chemistry**, n. 80, p. 261–273, 2003.
118. DUTRA, S.V., DAUDT, C.E., SOUZA, M. Aminoácidos livres e uréia durante a fermentação de mosto de chardonnay com diferentes leveduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, 1999.
119. PRIPIS-NICOLAU, L., REVEL, G., BERTRAND, A., MAULEAN, A. Formation of flavor components by reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild

- condition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9 p. 3761 – 3766, 2000.
120. HEMINGWAY, K.M., ALSTON, M.J., CHAPPELL, C.G., TAYLOR, A.J. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. **Carbohydrate Polymers**, v.38, p. 283 – 286, 1999.
- 121.MANNING, K., DAVIES, C. H., BOWEN, C., WHITE, P. J., Functional Characterization of Two Ripening-related Sucrose Transporters from Grape Berries. **Annals of Botany**, n. 87, p. 125 - 129, 2001.
122. DIÉGUEZ, S. C., LOIS, L. C., G!OMEZ, E. F., LA PEN, M. L. G., Aromatic composition ofthe Vitis vinifera grape Albarin. **Lebensm. -Wiss. u. -Technol.** n. 36 p. 585–590, 2003.